



Helena Isabel de Lemos Macedo

Licenciatura em Bioquímica

Avaliação da atividade anti-biofilme de produtos naturais isolados de actinobactérias marinhas para o desenvolvimento de uma tinta *antifouling*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Dr^a Susana P. Gaudêncio; REQUIMTE LAQV, UCIBIO DCV-FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Dr^a Rita Sobral; REQUIMTE UCIBIO, DCV-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Arguente: Doutora Sofia Rocha Pauleta

Vogal: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio de Matos



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2016

Helena Isabel de Lemos Macedo

Licenciatura em Bioquímica

**Avaliação da atividade anti-biofilme de produtos naturais
isolados de actinobactérias marinhas para o
desenvolvimento de uma tinta *antifouling***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Dr^a Susana P. Gaudêncio; REQUIMTE LAQV, UCIBIO DCV-FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Dr^a Rita Sobral; REQUIMTE UCIBIO, DCV-FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Arguente: Doutora Sofia Rocha Pauleta

Vogal: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio de Matos

Novembro 2016

Copyright © Helena Isabel de Lemos Macedo, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, as pessoas mais importantes da minha vida, obrigado por estarem presentes a cada segundo, por me incentivarem a lutar pelos meus objetivos e por nunca me deixarem desistir de nada. Foram eles que tornaram possível esta minha conquista. Este trabalho é dedicado a vocês.

Às minhas orientadoras, Doutora Susana P. Gaudêncio e Professora Rita Sobral, obrigado pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste ano e pela oportunidade de ingressar neste grupo de investigação.

À Doutora Susana Gonçalves, do Instituto Politécnico de Setúbal, agradeço toda a disponibilidade e os conselhos transmitidos no decorrer deste trabalho.

À Doutora Florbela Pereira agradeço a elucidação estrutural de compostos utilizados neste trabalho.

Ao Doutor Mário Diniz, obrigado pela ajuda na recolha de água do mar filtrada.

À Doutora Isabel Cunha, do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), obrigado pela realização dos ensaios anti-*macrofouling*.

Ao Doutor Markus Hoffmann e à Dr^a Elsa Soares da empresa HEMPEL, SA, agradeço a oferta das tintas anti-incrustantes e a criação de uma nova formulação de tinta especialmente para este trabalho.

À minha grande amiga Lúcia, obrigado pela partilha de mais uma etapa da nossa vida, talvez a mais difícil de todas, e pelos vinte e três anos de amizade que nos unem. Não são precisas grandes palavras para agradecer, ela sabe!

À minha amiga Márcia, obrigado pela partilha de conhecimentos e de grandes aventuras ao longo destes anos universitários e, sobretudo, pela transmissão de coragem e força para concluir esta etapa.

À Sofia, agradeço a partilha de conhecimentos, alegrias, tristezas e acima de tudo o facto de nunca me deixar sozinha ao longo destes meses. Um obrigado do tamanho do mundo!

Às minhas colegas de laboratório, Bárbara e Raquel, obrigado pelas palavras de incentivo, pela simpatia, amizade e pelo ótimo ambiente de trabalho.

À Nicole, agradeço a sua disponibilidade, compreensão e a partilha de bons momentos. É a alma do piso 3!

À Ana Fernandes e Fredilson agradeço a partilha de bons momentos e de conhecimentos ao longo deste projeto. Em especial agradeço à Marisa, pelo isolamento e elucidação estrutural de compostos utilizados nesta dissertação.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e FEDER pelo financiamento dos projetos PTDC/QUI-QUI/119116/2010, IF/00700/2014, UID/QUI/50006/2013 e UID/Multi/04378/2013 e ao Sétimo Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo n° PCOFUND-GA-2009-246542 e n° 269138-NanoGuard.

Resumo

A incrustação biológica ou *biofouling* caracteriza-se pela acumulação de organismos marinhos em superfícies submersas naturais ou artificiais. Este fenómeno gera impactos negativos associados a custos avultados na indústria naval devido à colonização de diversas estruturas por organismos incrustantes, afetando a hidrodinâmica da embarcação.

Com o intuito de minimizar a formação de camadas incrustantes à superfície dos navios, foram desenvolvidas várias perspetivas *antifouling* destacando-se as tintas anti-incrustantes compostas por biocidas. Porém, o grau de toxicidade associado a estes revestimentos impulsionou o desenvolvimento de estratégias ambientalmente viáveis baseadas na incorporação de compostos *antifouling* não-tóxicos em formulações de tintas.

Este estudo focou-se na avaliação da capacidade anti-biofilme por parte de 55 compostos isolados de actinobactérias marinhas, da espécie *Streptomyces aculeolatus*, contra duas bactérias marinhas formadoras de biofilmes, *Cobetia marina* (DSMZ 4741) e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (DSMZ 8798). Seis dos compostos apresentaram atividades anti-biofilme promissoras contra a bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, com percentagens de inibição acima dos 80%, destacando-se o composto PTM-420, F2+3, F22, com percentagem de inibição de formação de biofilme de 84%.

Para a avaliação da capacidade anti-incrustante dos compostos ativos, desenvolveu-se e otimizou-se um bioensaio que permite, à escala laboratorial, avaliar as atividades *antifouling* destes compostos.

Foram abordadas três metodologias utilizando tintas com e sem atividade *antifouling* para a pintura de pins, microplacas e placas de Petri. O composto comercial ácido 4-fenilbutanóico, com atividade anti-biofilme contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, foi incorporado numa tinta sem atividade *antifouling* para a otimização do ensaio.

A maximização da área de superfície conduziu à obtenção de melhores resultados e, assim sendo, recorreu-se à pintura de placas de Petri, para o ensaio anti-*microfouling*, com uma tinta sem atividade onde foi incorporado o composto PTM-420, F2+3, F22.

Este revestimento não demonstrou atividade anti-*microfouling* às concentrações de composto testadas, 0,1 e 1%, uma vez que não inibiu a formação do biofilme da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*.

Palavras-chave: actinobactérias marinhas, *Streptomyces aculeolatus*, tintas anti-incrustantes, metabolitos secundários, compostos anti-biofilme, compostos anti-incrustantes

Abstract

Biofouling is characterized by the accumulation of marine organisms on natural or artificial submerged surfaces. This phenomenon generates negative impacts associated with high costs in the shipping industry due to colonization of several structures by fouling organisms affecting the hydrodynamics of the vessel.

In order to minimize biofouling, several perspectives were developed such as antifouling paints with toxic compounds. However, the toxicity degree of these coatings promoted the development of environmentally viable strategies based on the incorporation of non-toxic antifouling compounds in paints.

This study is focused on the antibiofilm activity of 55 compounds isolated from marine actinobacteria, *Streptomyces aculeolatus*, against two marine biofilm bacteria, *Cobetia marina* (DSMZ 4741) and *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (DSMZ 8798). Six compounds showed powerful antibiofilm activities against *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* with percentages of inhibition above 80%. The compound PTM-420, F2+3, F22 showed percentage of inhibition of biofilm formation of 84%.

To evaluate antifouling activity of active compounds, was developed and optimized a new bioassay which allowed, in laboratory scale, evaluate antifouling activities of these compounds.

Three strategies were approached by using paints with and without antifouling activity for the painting of pins, microplates and petri dishes. The compound 4-phenylbutanoic acid, with antibiofilm activity against gram-positive and gram-negative bacteria, was incorporated in a paint without antifouling activity for optimization of bioassay.

The surface area maximization allowed to obtain better results and, therefore, petri dishes were painted for anti-microfouling test with a paint without activity where was incorporated the compound PTM-420, F2+3, F22.

This coating did not show antifouling activity for concentrations of 0.1% and 1% because it doesn't inhibit formation of biofilm of bacteria *M. hydrocarbonoclasticus*.

Keywords: marine actinobacteria, *Streptomyces aculeolatus*, antifouling paints, secondary metabolites, antibiofilm compounds, antifouling compounds

Índice de matérias

Agradecimentos	III
Resumo	V
Palavras-chave	V
Abstract	VII
Keywords	VII
Índice de matérias	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XV
Lista de abreviaturas	XVII
1. Introdução	1
1.1. Biofilmes microbianos – a primeira fase do <i>biofouling</i>	1
1.2. Composição dos biofilmes bacterianos e função biológica	1
1.3. Fases de desenvolvimento dos biofilmes bacterianos	2
1.4. <i>Biofouling</i> ou incrustação biológica	3
1.4.1. Fases de formação da incrustação biológica	3
1.4.2. Organismos associados às várias fases de formação da incrustação biológica	5
1.4.3. Consequências da incrustação biológica na indústria naval	7
1.5. Estratégias de combate da incrustação biológica	8
1.5.1. Sistemas anti-incrustantes: contextualização histórica	8
1.5.2. Tintas anti-vegetativas contendo biocidas utilizadas no combate da incrustação biológica	9
1.5.2.1. Tintas anti-incrustantes compostas por organometálicos	9
1.5.2.2. Principais tipos de tintas anti-incrustantes utilizadas na segunda metade do século XX	10
1.5.2.3. Alternativas às tintas compostas por tributilestanho	12
1.5.3. Tintas anti-vegetativas sem biocidas	13
1.5.3.1. Tintas anti-incrustantes com propriedades antiaderentes	13

1.5.3.2. Compostos de origem natural com propriedades anti-incrustantes: uma alternativa viável e ecológica.....	14
1.5.4. Actinobactérias e a importância dos metabolitos secundários	15
1.5.4.1. Compostos com atividade anti-incrustante produzidos por actinobactérias	15
1.6. Contextualização do trabalho e objetivos.....	19
2. Materiais e métodos.....	21
2.1. Meios de cultura, soluções e solventes.....	21
2.2. Recolha, processamento dos sedimentos oceânicos e obtenção de amostras – trabalho prévio	22
2.2.1. Amostras provenientes de actinobactérias.....	22
2.2.1.1. Obtenção de extratos brutos e compostos	22
2.2.1.2. Extratos brutos e compostos testados neste trabalho	23
2.3. Trabalho realizado nesta dissertação	25
2.3.1. Estirpes de bactérias marinhas formadoras de biofilme	25
2.3.1.1. Condições de crescimento bacteriano das estirpes bacterianas formadoras de biofilme.....	25
2.3.1.2. Monitorização do crescimento das culturas bacterianas	25
2.3.2. Ensaio da atividade anti-biofilme.....	25
2.3.3. Desenvolvimento e otimização de um novo ensaio anti-incrustante.....	26
2.3.3.1. Ensaio antifouling com pins revestidos	28
2.3.3.2. Ensaio antifouling através da pintura de placas de 96 poços	28
2.3.3.3. Ensaio antifouling através da pintura de placas de Petri.....	29
2.3.4. Avaliação do efeito <i>antifouling</i> de uma nova formulação de tinta sem biocidas	30
3. Apresentação e discussão dos resultados.....	33
3.1. Perfil de crescimento das culturas bacterianas	33
3.2. Resultados da atividade anti-biofilme das amostras testadas	34
3.3. Ensaio da atividade anti- <i>microfouling</i> : desenvolvimento e otimização.....	43
3.3.1. Atividade anti- <i>microfouling</i> do composto ácido 4-fenilbutanóico.....	43
3.3.2. Desenvolvimento do ensaio para testar a atividade anti- <i>microfouling</i> utilizando pins ..	43

3.3.3. Atividade <i>anti-microfouling</i> do composto ácido 4-fenilbutanóico utilizando microplacas de 96 poços	45
3.3.4. Atividade <i>anti-microfouling</i> do ácido 4-fenilbutanóico utilizando placas de Petri	48
3.3.5. Comparação dos ensaios <i>anti-microfouling</i> desenvolvidos	50
3.4. Atividade <i>anti-microfouling</i> de uma nova formulação de tinta com um composto natural incorporado	51
4. Conclusão e perspectivas futuras	55
5. Bibliografia	59
6. Anexos	65

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação esquemática dos passos envolvidos na formação de biofilmes. Retirada de (Monroe 2007).....	2
Figura 1.2. Etapas envolvidas na formação da incrustação biológica num substrato submerso. Adaptado de (Abarzua & Jakubowski 1995).	4
Figura 1.3. Organismos marinhos representativos da biodiversidade incrustante. Encontram-se separados de acordo com as suas dimensões Microfouling: bactéria (a), diatomácea (b), larva de verme (e), esporo de alga (b). Macro-incrustação: larva cípris de crustáceo (f), crustáceos adultos (g), mexilhão (i) e macroalgas (j). Retirada de (Silva et al. 2012).	5
Figura 1.4. Estruturas de um navio afetadas pela incrustação biológica. Adaptado de (Salta 2012).	7
Figura 1.5. Mecanismo de funcionamento de tintas à base de matrizes solúveis. Adaptado de (Almeida et al. 2007b).	10
Figura 1.6. Mecanismo de funcionamento de tintas à base de matrizes insolúveis. Adaptado de (Almeida et al. 2007b).	11
Figura 1.7. Mecanismo de funcionamento de tintas de auto-polimento. Adaptado de (Almeida et al. 2007).	12
Figura 1.8. Estrutura química de dicetopiperazinas com atividade anti-incrustante isoladas da bactéria <i>Streptomyces fungicidicus</i> (Li et al. 2006).	16
Figura 1.9. Estrutura química do ácido 12-metil-tetradecanóico (12-MTA) obtido de uma estirpe de <i>Streptomyces</i> (Xu et al. (2009)).	16
Figura 1.10. Estrutura química dos compostos 7-12, isolados a partir de extratos brutos obtidos de <i>Streptomyces albidoflavus</i> . Adaptado de (Xu et al. 2010).	17
Figura 1.11. Estrutura química da quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona). Adaptado de (Gopikrishnan & Radhakrishnan 2016).	17
Figura 1.12. Estruturas dos compostos isolados a partir de <i>Streptomyces praecox</i> . 14: (6S,3S)-6-benzil-3-metil-2,5-dicetopiperazina. 15: (6S,3S)-6-isobutil-3-metil-2,5-dicetopiperazina.	18
Figura 1.13. Estrutura química da ivermectina (22,23-dihidroavermectina) (80% 16 + 20% 17). Adaptado de (Pinori et al. 2011)	18
 Figura 2.1. Recolha de amostras oceânicas ao largo do arquipélago da Madeira. A: recolha de sedimentos marinhos a baixa profundidade. B: recolha à superfície.	22
Figura 2.2. Estrutura química do composto ácido 4-fenilbutanóico, Adaptado de (Nithya et al. 2011). 27	
Figura 2.3. Ensaio antifouling utilizando pins flutuantes mergulhados em cultura bacteriana.	28
Figura 2.4. Esquema da microplaca de 96 poços pintada com as diferentes formulações de tinta antes da adição de cultura bacteriana de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	29

Figura 2.5. Placas de petri pintadas com a tinta Hempel Antifouling Classic 76110 antes da adição de cultura bacteriana de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .	30
Figura 2.6. Estrutura química do composto PTM-420, F2+3, F22 pertencente à família das napiradiomicinas. Retirada de: (Motohashi, K. et al. 2008).	30
Figura 3.1. Perfil de crescimento das bactérias formadoras de biofilme utilizadas neste trabalho.	33
Figura 3.2. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> para o extrato bruto PTM-356, <i>Salinispora</i> sp.	35
Figura 3.3. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>C. marina</i> para o extrato bruto PTM-227, <i>Salinispora</i> sp.	36
Figura 3.4. Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>C. marina</i> .	37
Figura 3.5. Atividade anti-biofilme dos compostos naturais muito ativos.	39
Figura 3.6. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> para o composto natural PTM-420, F2+3, F22.	40
Figura 3.7. Atividade anti-biofilme dos compostos naturais ativos.	42
Figura 3.8. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme por <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> para o composto natural PTM-420, F2+3, F12.	42
Figura 3.9. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> para o composto ácido 4-fenilbutanóico.	43
Figura 3.10. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme da bactéria <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> para o composto ácido 4-fenilbutanóico a diferentes concentrações na tinta Hempel sem cobre relativos ao ensaio anti-incrustante de dois dias.	44
Figura 3.11. Resultados do ensaio com duração de dois dias de incubação.	45
Figura 3.12. Resultados do ensaio em microplacas com duração de uma semana de incubação.	46
Figura 3.13. Resultados do ensaio anti-incrustante em microplacas com um mês de incubação utilizando o composto ácido 4-fenilbutanóico às concentrações de 0,1, 1 e 5% na tinta Hempel sem cobre.	47
Figura 3.14. Resultados do ensaio com duração de uma semana de incubação utilizando placas de Petri.	48
Figura 3.15. Resultados do ensaio com duração de um mês de incubação utilizando placas de Petri.	49
Figura 3.16. Placas de Petri pintadas com a formulação de tinta Hempel Classic com 5 mL de cultura bacteriana de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> e contaminadas por fungos.	50
Figura 3.17. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> para o composto PTM-420, F2+3, F22 às concentrações de 0,1 e 1% na tinta Hempel sem cobre.	52

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Requerimentos necessários pra um sistema anti-incrustante ideal. (Chambers et al. 2006).....	13
Tabela 2.1. Solventes utilizados e respectivas marcas.	21
Tabela 2.2. Lista dos extratos brutos testados nesta dissertação isolados de <i>Salinispora</i> sp.....	23
Tabela 2.3. Lista dos compostos testados neste trabalho pertencentes à mesma espécie, <i>Streptomyces aculeolatus</i> , mas a estirpes diferentes: PTM-29, PTM-81, PTM-346, PTM-420.	24
Tabela 3.1. Taxa específica de crescimento e tempo de geração das bactérias em estudo.....	33
Tabela 3.2. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> de seis extratos brutos isolados de actinobactérias marinhas da espécie <i>Salinispora</i> sp.	35
Tabela 3.3. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme pela bactéria <i>C. marina</i> de seis extratos brutos isolados de actinobactérias marinhas da espécie <i>Salinispora</i> sp.....	36
Tabela 3.4. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme da bactéria <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , dos compostos muito ativos.....	38
Tabela 3.5. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , dos compostos ativos.....	41
Tabela 3.6. Comparação dos resultados obtidos durante um período de incubação de uma semana para duas das metodologias desenvolvidas: pintura de microplacas e de placas de Petri.	50
Tabela 3.7. Comparação dos resultados obtidos durante um período de incubação de um mês para duas das metodologias desenvolvidas: pintura de microplacas e de placas de Petri..	51
Anexo 1.1. Resultados dos compostos testados relativamente à inibição de crescimento e de formação de biofilme, que apresentaram resultados fora dos limites estabelecidos de inibição de crescimento e de formação de biofilme da bactéria <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	65
Anexo 1.2. Resultados dos compostos testados relativamente à inibição de crescimento e de formação de biofilme, que apresentaram resultados fora dos limites estabelecidos de inibição de crescimento e de formação de biofilme da bactéria <i>C.marina</i>	66

Lista de abreviaturas

C. marina: *Cobetia marina*

Cu₂O: óxido cuproso

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

OD: optical density (densidade ótica)

EC₅₀: concentração de uma determinada substância que induz metade do efeito máximo

EPS: substância exopoliméricas

IMO: Organização Marítima Internacional

LC₅₀: dose necessária de uma determinada substância para matar 50% da população em teste

M. hydrocarbonoclasticus: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

ON: *overnight*

PTM #: código de identificação da estirpe com o número #

QS: quorum sensing

ROS: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

SWA: água do mar filtrada

TBT: tributilestanho

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO

1.1. Biofilmes microbianos – a primeira fase do *biofouling*

Em contraste com o ambiente laboratorial, no qual os micro-organismos se desenvolvem sobretudo planctonicamente, em ambientes naturais, o crescimento microbiano ocorre preferencialmente sob a forma de agregados da mesma espécie ou de espécies diferentes, constituindo uma comunidade de micro-organismos, mais vulgarmente designada como biofilme. Os agregados de micro-organismos estão normalmente envolvidos por matrizes extracelulares que protegem as células de fatores exógenos, permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis (Costerton *et al.* 1999; Davey and Toole 2000).

Segundo Donlan (2002) um biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana sésil caracterizada por células irreversivelmente aderidas a um substrato, ou entre elas, envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas mesmas. Mais de 90% dos micro-organismos vivem sob a forma de biofilmes (J. Costerton *et al.* 1987) e a sua estrutura pode consistir apenas numa camada de células bacterianas ou adquirir uma disposição tridimensional.

1.2. Composição dos biofilmes bacterianos e função biológica

Dentro do tipo de micro-organismos que formam biofilmes, as bactérias são o grupo predominante representando somente uma minoria da massa total de biofilme, cerca de 10%. As substâncias extracelulares poliméricas (“Extracellular Polymeric Substances” – EPS) compostas por proteínas, polissacáridos, lípidos e ácidos nucleicos, constituem o maior componente do biofilme. Estas substâncias desempenham um papel importante no início da formação de biofilme mas também permitem o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional que confere proteção às células bacterianas restringindo o acesso de agentes antimicrobianos ao interior dos biofilmes, e fornecem um sistema de canais que permite armazenar os nutrientes e minerais necessários à sua sobrevivência (Watnick and Kolter 2000; J. W. Costerton *et al.* 1987; Gilbert *et al.* 1997).

A composição e a quantidade da matriz polimérica produzida são extremamente variáveis. Dependem do tipo de micro-organismo e das condições ambientais como nutrientes disponíveis, temperatura, pressão e oxigénio dissolvido (Toole *et al.* 2000; Flemming 1991).

No contexto de um biofilme, as bactérias habitam em grande proximidade com outras bactérias que podem ser, ou não, da mesma espécie, permitindo-lhes desenvolver mecanismos de comunicação designados por *quorum sensing* (QS), em que certos compostos metabólicos secretados atuam como sinais de comunicação para os restantes membros da comunidade do biofilme (Joshi *et al.* 2010; Kiran *et al.* 2008; Vickery *et al.* 2013). O QS desempenha um papel fundamental quer na fixação das células bacterianas a uma superfície quer na sua libertação de modo a colonizar outras superfícies (Donlan

2002). Além disto, permite à comunidade bacteriana uma rápida adaptação a alterações ambientais (Annous *et al.* 2009; Dobretsov *et al.* 2015).

Relativamente aos seus homólogos em estado planctónico, os micro-organismos presentes num biofilme apresentam uma resistência 10 a 1000 vezes superior a agentes antimicrobianos, entre outras vantagens como:

- Proteção contra o stresse ambiental como condições extremas de pH, oxigénio, temperatura, radiação UV;
- A matriz de polissacáridos extracelulares evita a desidratação das células bacterianas pela incorporação de moléculas de água;
- Aumenta a capacidade de adesão entre as células bacterianas que compõem o biofilme, favorecendo a troca de nutrientes, material genético e metabolitos (Annous *et al.* 2009; Costerton *et al.* 1999; Donlan 2002; Welch *et al.* 2012).

Por estes motivos muitas espécies bacterianas adotam um estilo de vida na forma sésil, desenvolvendo biofilmes, ao invés de permanecerem no estado planctónico.

1.3. Fases de desenvolvimento dos biofilmes bacterianos

A formação de um biofilme é composta por cinco etapas importantes, esquematizadas na figura 1.1. Inicialmente ocorre a adesão de células bacterianas planctónicas à superfície sólida submersa, seguida de crescimento e multiplicação bacteriana, produção de substâncias poliméricas que auxiliam na coesão da estrutura, maturação do biofilme e formação de uma estrutura mais organizada e, por fim, a dispersão do conteúdo celular e colonização de novas superfícies, figura 1.1 (Annous *et al.* 2009).

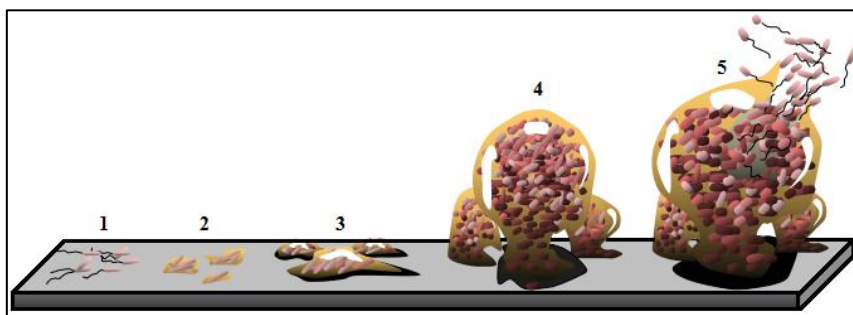


Figura 1.1. Representação esquemática dos passos envolvidos na formação de biofilmes. Este fenómeno inicia-se com a ligação de células bacterianas a uma superfície submersa em meio líquido (1) seguindo-se a ligação irreversível dessas mesmas células pela produção de EPS (2). Posteriormente ocorre o crescimento, multiplicação celular (3) e a maturação do biofilme (4), sendo a dispersão do conteúdo da estrutura desenvolvida a última etapa deste processo biológico (5). Retirada de (Monroe 2007).

O desenvolvimento desta estrutura complexa inicia-se com a formação de um filme orgânico composto por iões e moléculas orgânicas, provenientes do meio envolvente, que cobrem a superfície de adesão antes de ocorrer a fixação de micro-organismos. A atração inicial das células bacterianas planctónicas para a superfície ocorre aleatoriamente através do movimento browniano e da força gravitacional, ou de modo dirigido, por quimiotaxia e motilidade (Trentin *et al.* 2013). O passo crucial da formação de biofilme reside na ligação reversível de bactérias planctónicas dispersas no meio à superfície através de interações físico-químicas entre a bactéria e a superfície como forças de Van der Waals (Bixler and Bhushan 2012).

Após a adesão das células bacterianas ocorre produção, libertação e deteção de moléculas sinalizadoras auto-indutoras que regulam a formação do biofilme. De acordo com o aumento da densidade bacteriana, acumulam-se moléculas auto-indutoras que induzem a transcrição de genes que regulam diversas funcionalidades como motilidade, virulência, produção de EPS e a formação de biofilmes (Davies *et al.* 1998).

A passagem para o estado irreversível envolve a produção de substâncias poliméricas extracelulares pelas bactérias conferindo uma maior coesão à estrutura e possibilitando a adesão de outros micro-organismos (Bixler and Bhushan 2012; Srey *et al.* 2013). A acumulação e crescimento de micro-organismos nas superfícies promovem a formação de micro-colónias que resultam do recrutamento de células planctónicas do meio envolvente, através de comunicação célula-célula.

Segue-se a fase de maturação do biofilme, etapa de consolidação da estrutura desenvolvida. Esta fase é atingida ao fim de um dia ou várias semanas dependendo do(s) micro-organismo(s) envolvido(s) e das condições ambientais (Chmielewski and Frank 2003). Os biofilmes maduros consistem em estruturas semelhantes a cogumelos envolvidos por EPS e permeados por canais que funcionam como um sistema de entrega de nutrientes da superfície para o interior do biofilme e de remoção de restos metabólicos (Hall-stoodley *et al.* 2004).

A dispersão do material é a ultima etapa do ciclo de formação do biofilme e resulta da sua rutura, completa ou parcial, permitindo que o conteúdo celular libertado possa colonizar novos locais e iniciar um novo ciclo de formação de biofilme (Annous *et al.* 2009; Xavier *et al.* 2003).

1.4. Biofouling ou incrustação biológica

1.4.1. Fases de formação da incrustação biológica

Qualquer superfície submersa em água está sujeita não só ao poder corrosivo e desgastante do meio envolvente, mas também ao fenómeno designado por incrustação biológica (Salta 2012).

A incrustação biológica é definida pelo crescimento indesejado de organismos de dimensões reduzidas como bactérias, algas, fungos e espécies de maiores dimensões como crustáceos, à superfície de substratos húmidos sejam eles de cariz natural como as rochas ou até mesmo outros organismos, ou

artificial como os cascos dos navios. Destaca-se o cenário marinho, com a formação de incrustação biológica por espécies especificamente marinhas.

Este processo bastante dinâmico abrange organismos de diferentes dimensões e o seu desenvolvimento demora semanas ou meses (Magin *et al.* 2010). A sua formação divide-se em quatro fases distintas: formação de uma camada de substâncias orgânicas no substrato, primeira colonização por micro-organismos, colonização unicelular por esporos de algas e, por fim, fixação de macro-organismos, figura 1.2 (Wahl 1989; Chambers *et al.* 2006; Abarzua and Jakubowski 1995).

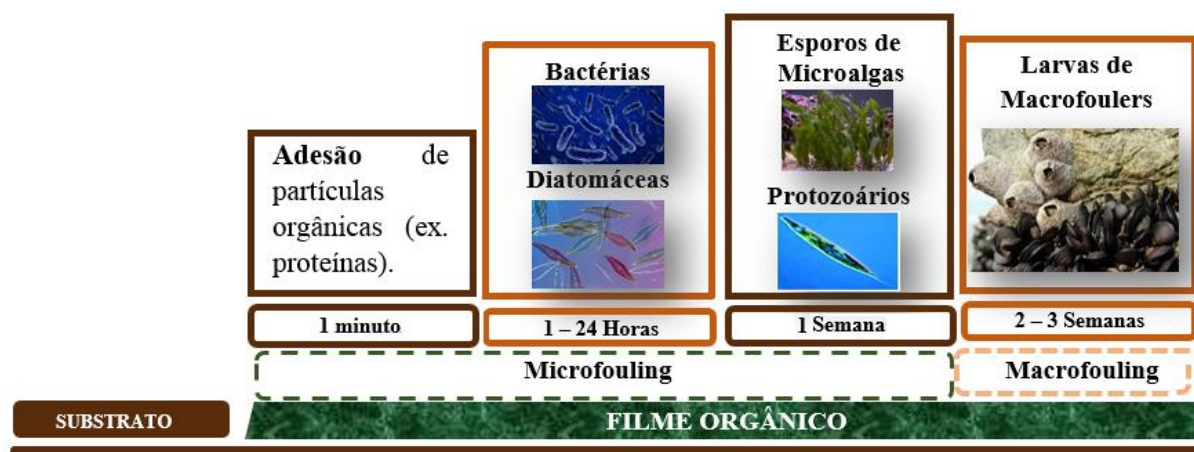


Figura 1.2. Etapas envolvidas na formação da incrustação biológica num substrato submerso. A primeira etapa caracteriza-se pela adesão de partículas orgânicas seguindo-se a colonização por bactérias e diatomáceas – primeiros organismos colonizadores. Segue-se a colonização por esporos de microalgas e protozoários, finalizando-se com a fixação de organismos de maiores dimensões. Adaptado de (Abarzua & Jakubowski 1995).

A primeira etapa do desenvolvimento da incrustação biológica acontece segundos após o contacto entre a superfície e a solução aquosa. Este contacto permite a adsorção de proteínas, polissacáridos e glicoproteínas (Almeida *et al.* 2007). A camada de proteínas que se deposita na superfície submersa atua como um filme que, ao fim de 1 a 2 horas, permite o recrutamento de células bacterianas que se encontram próximas do substrato (Wahl 1989; Abarzua and Jakubowski 1995), resultando na formação de biofilme ou *microfouling*.

A transição do estado de *microfouling* para uma estrutura mais complexa envolve a fixação de organismos de maiores dimensões. Estes macro-organismos apresentam uma elevada taxa de crescimento, um baixo grau de preferência pelo substrato e alta capacidade de adaptação a ambientes hostis, tornando o biofilme numa comunidade heterogénea, muito complexa e resistente a agentes anti-incrustantes (Yebra *et al.* 2004).

1.4.2. Organismos associados às várias fases de formação da incrustação biológica

As comunidades incrustantes são bastante diversificadas, compostas por uma ou mais camadas do mesmo organismo ou estratos constituídos por diversos organismos (Da Gama *et al.* 2009). A ampla diversidade de organismos incrustantes, que ultrapassa as 4000 espécies, com origens filogenéticas, estratégias de vida, nutrição e capacidades competitivas distintas tornam o estudo da bioincrustação essencial para o desenvolvimento de estratégias para a proteção de superfícies desenvolvidas pelo Homem (Yebra *et al.* 2004; Da Gama *et al.* 2009). O *biofouling* é composto por organismos micro e macro-incrustantes, figura 1.3, mas é importante realçar que a micro-incrustação antecede a macro-incrustação (Salta 2012).

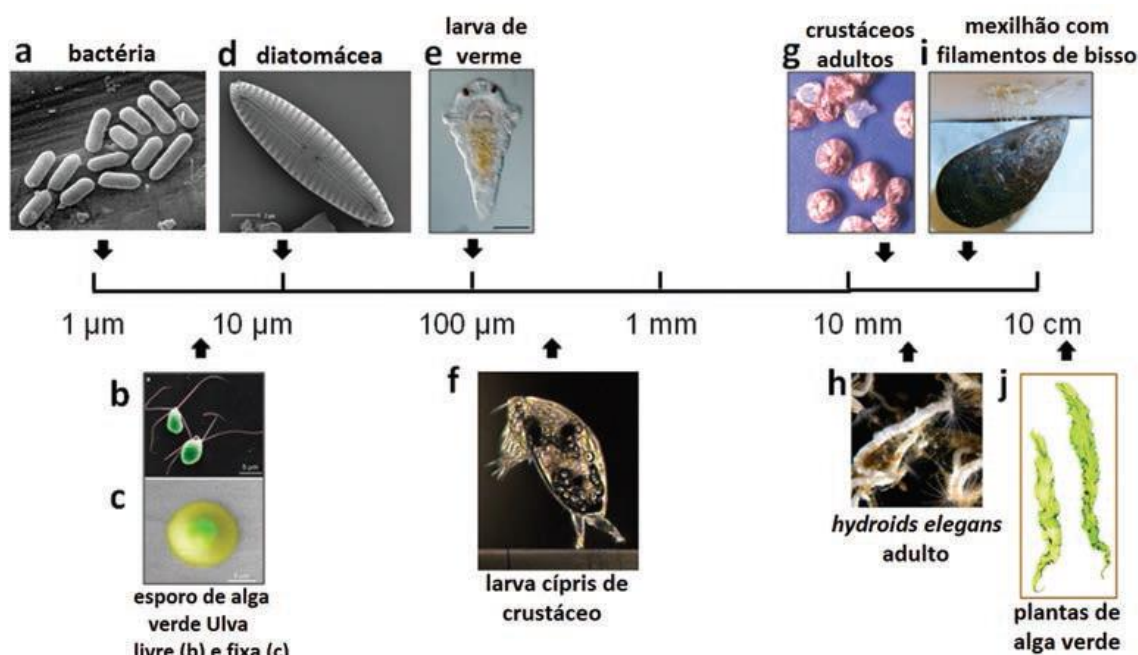


Figura 1.3. Organismos marinhos representativos da biodiversidade incrustante. Encontram-se separados de acordo com as suas dimensões *Microfouling*: bactéria (a), diatomácea (b), larva de verme (e), esporo de alga (b). *Macro-incrustação*: larva cípris de crustáceo (f), crustáceos adultos (g), mexilhão (i) e macroalgas (j). Retirada de (Silva et al. 2012).

Micro-incrustação: primeira camada de células que se fixa ao substrato minutos após a sua imersão em meio líquido. Termo também designado por biofilme marinho, que engloba os organismos mais simples e de menores dimensões como bactérias formadoras de biofilme e diatomáceas. As bactérias *Cobetia marina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* são dois exemplos de bactérias formadoras de biofilmes marinhos que já foram alvo de estudos relativamente à inibição da sua fixação a superfícies submersas, como referenciam Ekblad *et al.* e Souza *et al.*.

Cobetia marina

Bactéria aeróbia, gram-negativa, que se desenvolve em condições halofílicas. Foi pela primeira vez isolada em 1970 das águas do mar do litoral de Woodshole, na costa oeste dos EUA (Cobet *et al.* 1971). Em termos morfológicos apresenta forma de bastonete, com comprimento entre 1,6-4,0 µm e diâmetro entre 0,8-1,2 µm. As colónias têm aspeto liso, de cor creme e de forma redonda (Florian *et al.* 2015; Arahal *et al.* 2002). Para além destas características, a *Cobetia marina* é capaz de produzir largas quantidades de EPS, sendo estas compostas maioritariamente por ácidos urónicos (Mieszkin *et al.* 2012)

Marinobacter hydrocarbonoclasticus

Bactéria aeróbia gram-negativa isolada do mar Mediterrâneo ao largo da costa Francesa, perto de uma refinaria de petróleo (Gauthier *et al.* 1992). Extremamente halotolerante, cresce em concentrações de NaCl entre 0,08 e 5,5M, e é moderadamente halofílica (Gorshkova *et al.* 2003; Gauthier *et al.* 1992). Apresenta forma de bastonete (0,3-0,6 µm de diâmetro e 2-3 µm de comprimento na fase exponencial de crescimento) e não forma esporos. Possui um único flagelo, em meios com concentração de NaCl entre 0,6-1,5M e não possui flagelos em meios com concentração de NaCl igual ou inferior a 0,2 M (Christen *et al.* 1992). Em meio sólido forma colónias de cor branca, sendo esta cor alterada para bege após 48h de incubação.

Apresenta capacidade de degradação de hidrocarbonetos utilizando-os como fonte de carbono e energia, e possui resistência a diversos antibióticos como tetraciclina, novobiocina e estafilomicina (Ventosa & Márquez 2005; Gauthier *et al.* 1992).

Existe, no entanto, uma ampla variedade de bactérias formadoras de biofilmes marinhos como α -proteobactérias (ex. *Roseobacter*), γ -proteobactérias (ex. *Alteromonas*), cianobactérias e actinobactérias (Salta 2012).

Macro-incrustação: após a formação da micro-incrustação à superfície do substrato, ocorre a deposição e adesão de organismos, como macro-organismos “moles”, por exemplo as macroalgas, corais, esponjas, moluscos (*soft macrofouling*), ou macro-organismos “duros” como os mexilhões e as cracas (*hard macrofouling*). Esta fase ocorre ao fim de alguns dias de imersão da superfície e, normalmente, uma a duas semanas são suficientes para o seu desenvolvimento, dependendo das condições ambientais circundantes (Silva *et al.* 2012).

É importante realçar que não são as espécies no estado adulto que se fixam ao substrato mas a sua forma larvar, antes da metamorfose (Mieszkin *et al.* 2012). Uma simples craca da espécie *Balanus* produz, na época de reprodução, cerca de 10.000 larvas que se irão fixar e desenvolver numa superfície submersa. Relativamente ao tempo de colonização do substrato, existem diferenças entre as espécies incrustantes. No caso de larvas de mexilhão, a sua fixação a uma superfície pode levar cerca de 6 meses

enquanto que larvas de vermes tubulares e hidróides podem colonizá-la numa hora (www.international-marine.com/PaintGuides/WhatIsFouling.pdf, consultado a 4/5/16).

1.4.3. Consequências da incrustação biológica na indústria naval

A incrustação biológica provoca prejuízos de mais de 200 mil milhões de dólares na indústria naval. A camada bioincrustante que se forma á superfície do casco da embarcação promove o desenvolvimento de irregularidades no casco, causando o aumento da sua rugosidade e do arrasto. Assim, é necessário um maior gasto energético para que a embarcação mantenha a velocidade alcançada pela mesma quando se encontra livre de incrustação.

Uma camada incrustante de cerca de 1mm de espessura numa embarcação com 23 metros de comprimento provoca um aumento de atrito de 80% e perda de velocidade de 15% em comparação com a embarcação livre de incrustação. As embarcações possuem várias estruturas submersas que são facilmente colonizadas pelos organismos marinhos, figura 1.4, que vão desde os cascos até às condutas do navio e aos tanques de lastro onde circula água do mar, conduzindo aos seguintes problemas (Yebra *et al.* 2004):

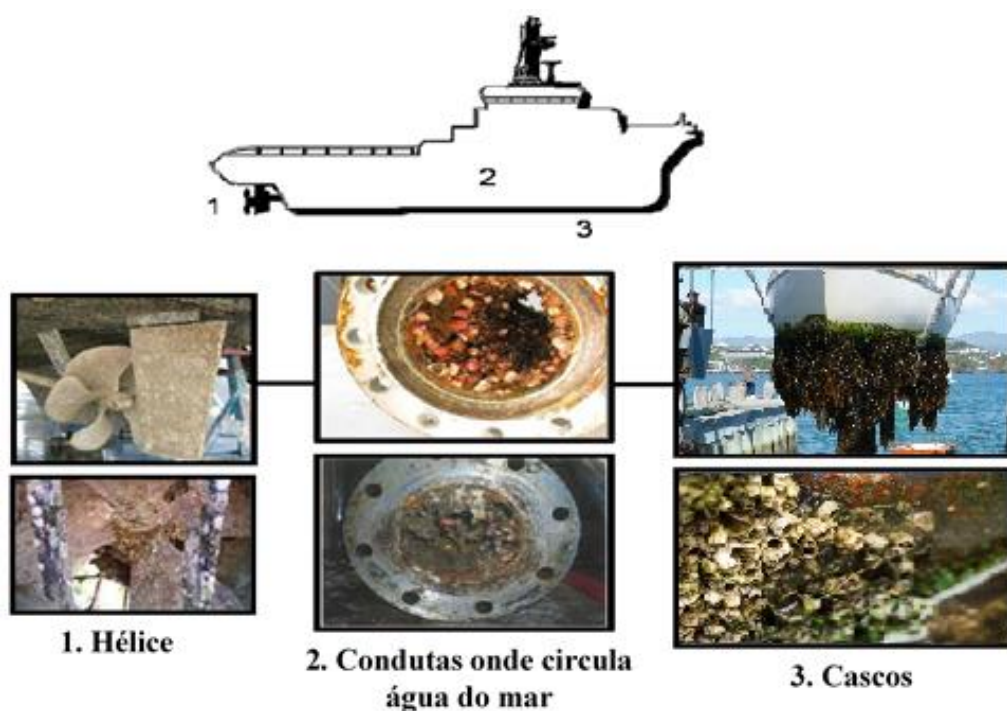


Figura 1.4. Estruturas de um navio afetadas pela incrustação biológica. 1. Hélice, 2. Condutas do navio onde circula água salgada, 3. Casco da embarcação. Perceível o desenvolvimento de incrustação em todas as superfícies apresentadas verificando-se uma maior camada incrustante nos cascos do navio. Adaptado de (Salta 2012).

- Aumento do atrito provocado pelo aumento do peso do navio e da rugosidade do casco, com a consequente diminuição da velocidade e da capacidade de manobra;
- Deterioração do revestimento da embarcação por corrosão e descoloração;
- Aumento do período de doca seca para remoção da incrustação e consequente aumento de custos de mão-de-obra;
- Diminuição do período entre docagens;
- Desequilíbrios ecológicos por introdução de espécies em ambientes aos quais não pertencem.

Uma superfície com altos níveis de incrustação conduz ao aumento de 40% no consumo de combustível provocando uma maior libertação de gases nocivos para a atmosfera. Um navio operacional sem qualquer tipo de proteção anti-incrustante promove um aumento de 50% do consumo de combustível em apenas 6 meses e a libertação de uma quantidade extra para a atmosfera de 210 milhões de toneladas de dióxido de carbono e 5,6 milhões de toneladas de dióxido de enxofre (www.international-marine.com/PaintGuides/WhatIsFouling.pdf, consultado a 4/5/16; Da Gama *et al.* 2009).

Apesar das macro-incrustações provocarem alterações da hidrodinâmica do navio e a sua deterioração, são as micro-incrustações que possuem o papel principal no desenvolvimento do *biofouling* uma vez que permitem a fixação de organismos de maiores dimensões (Salta 2012).

1.5. Estratégias de combate da incrustação biológica

1.5.1. Sistemas anti-incrustantes: contextualização histórica

Desde a Antiguidade que são desenvolvidos diversos métodos de proteção dos cascos das embarcações contra a fixação de micro e macro-organismos marinhos. Com este objetivo foram utilizados produtos como cera, alcatrão e asfalto para revestir embarcações de madeira até meados do século XIX (Woods Hole Oceanographic Institution 1952). Os Fenícios e Cartagineses foram os primeiros a introduzir o cobre como medida preventiva (700 A.C.). Gregos e Romanos (200 A.C.) adotaram a mesma estratégia e recorreram ainda a revestimentos de chumbo para revestir embarcações de madeira (Almeida *et al.* 2007; Yebra *et al.* 2004; Woods Hole Oceanographic Institution 1952).

Em 1625, William Beale patenteou uma mistura letal com propriedades anti-incrustantes que combinava arsénio, goma em pó e cobre (Woods Hole Oceanographic Institution 1952). Foram desenvolvidos revestimentos não-metálicos como borracha e cortiça, mas não passaram a ser utilizados como revestimentos devido aos elevados custos e às suas difíceis aplicações (Almeida *et al.* 2007b; Yebra *et al.* 2004; Woods Hole Oceanographic Institution 1952).

O facto destas perspetivas não serem suficientemente eficientes contra alguns organismos marinhos envolvidos no processo incrustante, proporcionou o desenvolvimento de métodos mais

eficazes. Assim, em meados do século XIX surgiram as tintas anti-vegetativas cuja proteção contra a fixação biológica é assegurada pelo uso de compostos tóxicos.

Esta nova metodologia baseava-se na dispersão de biocidas como o cobre, o arsénio e o óxido de mercúrio em óleo de linhaça ou colofónia (Almeida *et al.* 2007b). Porém, este tipo de revestimentos perdia a eficiência em menos de um ano e, portanto, tornou-se necessária a descoberta de biocidas mais eficazes (Castro *et al.* 2011).

1.5.2. Tintas anti-vegetativas contendo biocidas utilizadas no combate da incrustação biológica

1.5.2.1. Tintas anti-incrustantes compostas por organometálicos

As primeiras tintas organometálicas compostas por arsénio, estanho, mercúrio, entre outros, surgiram em 1950. Após numerosos desenvolvimentos, surgiram as tintas à base de tributilestanho (TBT) que se tornaram célebres pela elevada eficiência (Almeida *et al.* 2007).

Ao contrário do estanho inorgânico, o TBT é lipossolúvel e penetra nas membranas celulares vivas, tornando-o num potente pesticida (Da Gama *et al.* 2009). Este tipo de tintas foi utilizado pela indústria naval por mais de duas décadas e em 1980 revestiram cerca de 90% das embarcações operacionais em todo o mundo (Castro *et al.* 2011).

Apresentavam uma eficácia cinco vezes superior às tintas baseadas em óxido de cobre, com a vantagem de não causarem corrosão em alumínio e aço (Da Gama *et al.* 2009). Porém, após vários estudos realizados, o TBT foi descrito como a substância mais tóxica introduzida no ambiente marinho, provocando efeitos adversos em organismos não-alvo, tais como (Yebra *et al.* 2004):

- Imposex: fenómeno que abrange mais de 200 espécies espalhadas por todo o mundo promovendo o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos, como pénis e canal deferente, em fêmeas de moluscos.
- Deformação de conchas;
- Resposta imunitária e efeitos genéticos e neurotóxicos em outras espécies marinhas.

Esta problemática conduziu à proibição da aplicação de tintas de organoestanho a partir de 1 de Janeiro de 2003 pela Organização Marítima Internacional (IMO) e obrigou à sua completa remoção das embarcações até ao dia 1 de Janeiro de 2008 (Yebra *et al.* 2004).

1.5.2.2. Principais tipos de tintas anti-incrustantes utilizadas na segunda metade do século XX

Os tipos de tintas desenvolvidos até à segunda metade do século XX diferenciam-se de acordo com o mecanismo adotado para a libertação do agente biocida. Existem três classes de tintas anti-incrustantes: tintas com matriz solúvel, tintas com matriz insolúvel e tintas de auto-polimento. Os mecanismos de libertação do agente tóxico determinam a aplicação da tinta, o seu comportamento e a sua duração (Almeida *et al.* 2007b; Yebra *et al.* 2004).

I. Tintas de matriz solúvel

As tintas anti-incrustantes de matriz solúvel foram desenvolvidas com o intuito de conferir uma proteção mais prolongada às superfícies contra a incrustação biológica.

A sua constituição incorpora uma matriz polimérica, que se dissolve em contacto com a água do mar, libertando o agente biocida como o óxido de cobre, ferro ou zinco.

O facto da matriz polimérica ser constituída por proporções elevadas de resinas de carácter ácido e com grupos carboxílicos auxilia a sua erosão no ambiente marinho. Este tipo de resinas reage com os iões sódio e potássio, componentes da água do mar, promovendo a libertação dos compostos retidos na matriz. Os principais inconvenientes deste revestimento baseiam-se na rápida velocidade de dissolução da resina e na sua fragilidade conduzindo a períodos de proteção que não se estendem por mais 15 meses, figura 1.5 (Yebra *et al.* 2004; Almeida *et al.* 2007b).

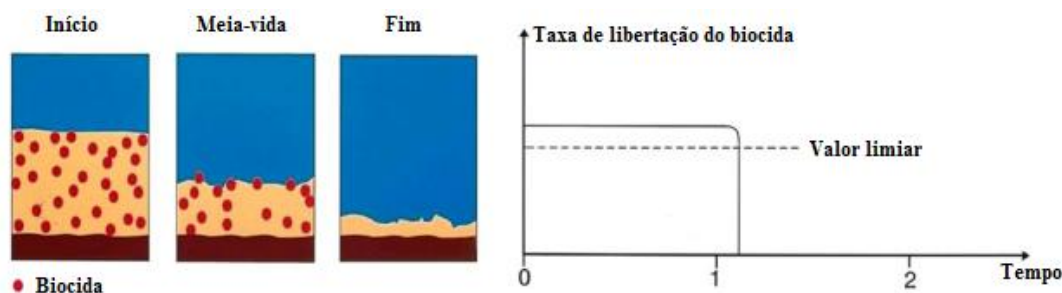


Figura 1.5. Mecanismo de funcionamento de tintas à base de matrizes solúveis. O agente biocida é libertado ao longo do tempo à medida que a matriz polimérica é erodida pela água do mar. Adaptado de (Almeida *et al.* 2007b).

II. Tintas de matriz insolúvel

O facto das tintas com matriz solúvel não conferirem uma proteção eficiente por mais de 15 meses conduziu ao desenvolvimento de tintas de matriz insolúvel. Estes revestimentos são compostos por matrizes poliméricas insolúveis não degradáveis em contacto com a água do mar. Uma ampla gama de polímeros insolúveis à base de acrílicos, vinílicos ou de borracha clorada são utilizados como matrizes poliméricas onde se incorporam os biocidas.

Estas tintas apresentam boa resistência mecânica permitindo a integração de altas cargas de compostos biocidas favorecendo uma lixiviação gradual. Devido à natureza insolúvel da matriz, a água do mar lixívia os biocidas mais próximos da superfície de contacto, formando poros na resina permitindo que a água do mar continue a dissolver o restante conteúdo tóxico disperso pelo restante filme de tinta.

Porém, os compostos biocidas ficam mais distantes da superfície do revestimento e a velocidade de lixiviação decai, tornando a proteção menos eficiente (Almeida *et al.* 2007b). Apesar de serem mecanicamente fortes, estes revestimentos demonstram eficiência anti-incrustante durante 12 a 24 meses, figura 1.6 (Almeida *et al.* 2007a).

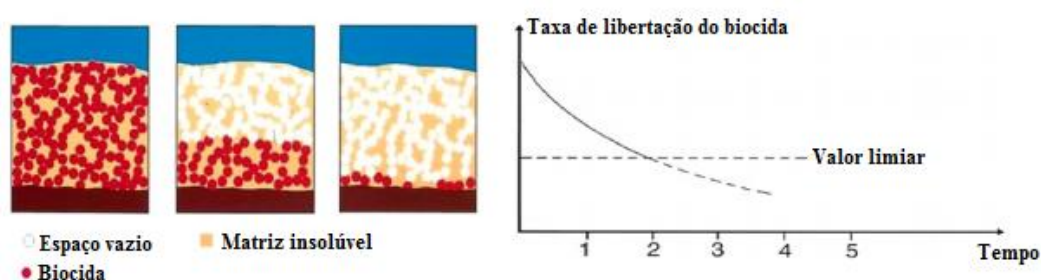


Figura 1.6. Mecanismo de funcionamento de tintas à base de matrizes insolúveis. O agente biocida é libertado após o contacto da matriz com a água do mar. À medida que os biocidas são libertados, vão sendo formados poros na matriz insolúvel permitindo a lixiviação das partículas que se encontram mais afastadas da superfície de contacto do filme de tinta com a água do mar. Adaptado de (Almeida *et al.* 2007b).

III. Revestimentos de auto-polimento

As tintas auto-polimetantes eram formadas por polímeros acrílicos, usualmente o metacrilato de metilo, com moléculas tóxicas, compostos de tributilestanho, inseridas na cadeia polimérica através de ligações éster. O biocida libertava-se lentamente e de forma controlada durante toda a vida da pintura, através de uma reação química com a água do mar promovendo a hidrólise da ligação resina-biocida. Por outro lado, o facto da matriz polimérica ser hidrofóbica, dificultava a penetração da água do mar, atrasando a libertação do TBT para o ambiente marinho aumentando a sua eficiência anti-incrustante. O facto dos revestimentos auto-polimetantes serem compostos por matrizes hidrofóbicas e manterem o TBT co-polimerizado, permitiam controlar a velocidade de libertação do mesmo conferindo uma elevada eficácia anti-incrustante com a incorporação de reduzidas quantidades de TBT.

As tintas de auto-polimento apresentavam eficiência durante 60 meses e não era necessária a sua remoção no processo de repintura. Foram uma mais-valia para a indústria naval e cerca de 70% das embarcações comerciais utilizavam as tintas auto-polimetantes como método preventivo em 1999, figura 1.7 (Omae 2003; Almeida *et al.* 2007b; Yebra *et al.* 2004).

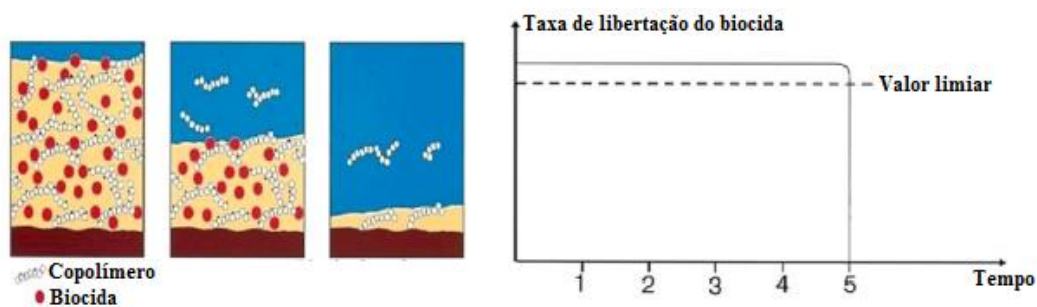


Figura 1.7. Mecanismo de funcionamento de tintas de auto-polimento. O agente biocida é libertado de forma controlada, ao longo do tempo, através da quebra da ligação química entre o biocida e a matriz promovida pelo contacto com a água do mar. A taxa de libertação de biocida é controlada durante 5 anos, e ao fim deste período termina a eficiência anti-incrustante do revestimento. Adaptado de (Almeida *et al.* 2007).

1.5.2.3. Alternativas às tintas compostas por tributilestanho

A restrição mundial do uso de tintas anti-incrustantes com compostos de organoestanho na sua composição tornou urgente o desenvolvimento de novas perspectivas ambientalmente viáveis permitindo que compostos à base de cobre voltassem a ser utilizados nas formulações das tintas anti-vegetativas.

Os compostos de cobre como o óxido cuproso (Cu_2O), o tiocianato de cobre (CuSCN) e o cobre metálico são os biocidas atualmente utilizados em tintas anti-vegetativas. O cobre é um dos pesticidas mais utilizados na agricultura e a sua toxicidade é dependente da sua forma. Na água, o cobre pode encontrar-se na forma livre, associado a espécies orgânicas e inorgânicas ou na forma hidratada. Quando este composto se encontra ligado a partículas torna-se menos biodisponível e menos tóxico que o cobre livre.

O cobre na forma Cu^{2+} não apresenta eficiência contra todos os organismos incrustantes e a sua ação diminui de forma decrescente contra microrganismos, invertebrados, algas, bivalves e macrófitos.

De modo a garantir uma proteção contra um maior número de organismos marinhos são utilizados biocidas de reforço juntamente com o cobre como o piritionato de zinco, o Irgarol 1051 e o SeaNine 211, com o intuito de reforçar a eficiência anti-incrustante do revestimento e de controlar a resistência que determinados organismos desenvolveram para o cobre (Voulvoulis *et al.* 1999). Foram detetados elevados níveis de cobre em áreas de intensa operação naval devido ao aumento do uso deste tipo de tintas anti-vegetativas (Martins and Vargas 2013)

Os mecanismos associados à toxicidade do cobre envolvem a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS) causando danos em diversas moléculas biológicas como o DNA, as proteínas e os lípidos, favorecendo a desintegração de membranas e de organelos celulares (Kaiser *et al.* 2013).

1.5.3. Tintas anti-vegetativas sem biocidas

De modo a evitar qualquer tipo de contaminação aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes com produtos tóxicos incorporados, é de máxima importância o desenvolvimento de um revestimento que cumpra critérios ecológicos mas que apresente simultaneamente elevados níveis de eficácia contra a incrustação biológica (Satheesh *et al.* 2016; Vimala 2016). Um bom sistema anti-incrustante deve respeitar as características presentes na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Requerimentos necessários pra um sistema anti-incrustante ideal. (Chambers et al. 2006).

Deve ser:	Não deve ser:
Anticorrosivo	Tóxico para o meio ambiente
Anti-incrustante	Persistir no meio ambiente
Aceitável ambientalmente	Dispendioso
Viável em termos económicos	Instável quimicamente
Efetivo durante um longo período de tempo	Afetar espécies não-alvo
Resistente à abrasão/biodegradação/erosão	
Conferir proteção independentemente do perfil operacional	

1.5.3.1. Tintas anti-incrustantes com propriedades antiaderentes

Embora seja bastante difícil o desenvolvimento de um sistema anti-incrustante livre de biocidas, que apresente elevada eficiência e seja economicamente aceitável, a pressão existente no desenvolvimento de revestimentos quase inócuos conduziu ao aparecimento de uma nova tecnologia anti-incrustante. As tintas do tipo *fouling-release* possuem superfícies ultra-lisas de carácter hidrofóbico e asseguram uma baixa fricção de modo a impedir a fixação de organismos incrustantes aos cascos das embarcações. Contudo, mesmo que alguns incrustantes se fixem, estes podem ser removidos pela água do mar ou pela ação de um simples jato de água com o intuito de evitar custos de manutenção avultados (Almeida *et al.* 2007b).

Entre todos os polímeros atualmente disponíveis são os fluoropolímeros e os silicones que correspondem às exigências adotadas por este tipo de revestimento. A comparação entre os dois polímeros apresentados permitiu concluir que os silicones aplicados em camadas relativamente espessas apresentam uma maior anti-aderência que os fluoropolímeros.

Polímeros à base de poli(dimetilsiloxano) são amplamente utilizados nas formulações destas tintas devido à sua baixa energia de superfície, baixa microrugosidade e maior eficiência anti-aderente

comparativamente aos fluoropolímeros. As superfícies dos revestimentos com poli(dimetilsiloxano) apresentam a mobilidade adequada para impedir a fixação de muitos organismos marinhos. Porém, estas tintas anti-aderentes apresentam desvantagens associadas ao elevado custo de aplicação, à sensibilidade a danos mecânicos e ao risco de contaminação ambiental por silicone (Yebra *et al.* 2004; Chambers *et al.* 2006; Almeida *et al.* 2007).

1.5.3.2. Compostos de origem natural com propriedades anti-incrustantes: uma alternativa viável e ecológica

Existem diversos organismos marinhos como as algas, esponjas e corais que são colonizados por organismos incrustantes, de forma semelhante ao que acontece à superfície dos cascos de embarcações. Contudo, alguns destes tipos de organismos desenvolveram mecanismos de defesa eficientes contra a bioincrustação, como a produção de metabolitos secundários, permanecendo a sua superfície livre de qualquer tipo de incrustação (Vimala 2016; Satheesh *et al.* 2016). Os metabolitos secundários produzidos apresentam toxicidades reduzidas uma vez que se degradam mais rapidamente. A proteção das superfícies é garantida não pelo grau de toxicidade dos metabolitos, mas pela repelência promovida contra as larvas dos organismos incrustantes. Contudo, ainda existem poucos estudos que comprovem a baixa toxicidade ambiental associada aos compostos de origem natural (Da Gama *et al.* 2009).

No ambiente aquático, os organismos de maiores dimensões são normalmente colonizados por micro-organismos que residem nas águas circundantes. Esta associação simbiótica entre macro e micro-organismos promove a obtenção de metabolitos secundários biologicamente ativos secretados como mecanismo de defesa pelo organismo colonizador. Um exemplo desta natureza é descrito por Lee *et al.* (2001), em que um metabolito secundário da classe dos macrolídeos, produzido pela esponja *Theonella swinhoei* é sintetizado por uma bactéria simbiote residente no endossoma desta espécie de esponja e apresenta atividade antifúngica (Unson *et al.* 1994).

Encontram-se descritas na literatura várias substâncias com atividade anti-incrustante, tendo sido testadas contra larvas de organismos incrustantes, tais como cracas e briozoários (Da Gama *et al.* 2009).

Bactérias marinhas pertencentes à ordem *Actinomycetales* constituem uma fonte pouco explorada de metabolitos com uma ampla gama de atividades biológicas, tendo sido já comprovada a sua capacidade de produção de compostos com atividade anti-*macrofouling* e anti-biofilme.

1.5.4. Actinobactérias e a importância dos metabolitos secundários

A investigação destes micro-organismos teve início em actinobactérias de origem terrestre e os seus metabolitos secundários destacam-se pelo facto de apresentarem uma elevada importância para a indústria farmacêutica (Mincer *et al.* 2002; Jensen, Mincer, *et al.* 2005).

O extenso estudo e exploração das actinobactérias terrestres promoveu o decréscimo ou até mesmo a estagnação da descoberta de novos compostos promissores. De modo a combater esta problemática, uma nova perspetiva emergiu com o intuito de descobrir novos compostos bioativos com diferentes funcionalidades obtidos de actinobactérias marinhas.

Alguns ecossistemas aquáticos como os recifes de coral e o fundo oceânico possuem uma diversidade biológica que se sobrepõe à existente em florestas tropicais (Haefner 2003).

A adaptação das actinobactérias marinhas às condições ambientais proporcionadas pela água do mar, como temperaturas baixas, elevado teor de sal, altas pressões e pH baixo, reflete-se numa diversidade genética e metabólica superior das actinobactérias marinhas relativamente aos seus homólogos terrestres (Bull *et al.* 2000; Lam 2006; Jensen, Mincer, *et al.* 2005).

As actinobactérias marinhas incluem membros dos géneros *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Prauserella*, *Serinicoccus*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Lamerjespora*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Marinactinospora*, *Sciscionella*, *Salinispora* e *Marinospora* (Subramani & Aalbersberg 2012; Jensen, Gontang, *et al.* 2005). Apesar da exploração de actinobactérias marinhas ser uma prática relativamente recente, já foram isolados metabolitos secundários produzidos pelas mesmas com diversas atividades biológicas, tais como: antifúngicas, anticancerígenas, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias e anti-incrustantes (Lam 2006).

1.5.4.1. Compostos com atividade anti-incrustante produzidos por actinobactérias

Nas últimas décadas foram isolados vários compostos com potente atividade anti-incrustante, a partir de organismos marinhos como corais, esponjas, algas e bactérias. A razão LC_{50}/EC_{50} expressa a eficácia do composto em relação à sua toxicidade. Para a incorporação de um composto num revestimento anti-incrustante, este tem que apresentar uma razão LC_{50}/EC_{50} bastante superior a 1 (Xu *et al.* 2010). LC_{50} (“*Lethal concentration*”) é definido pela dose letal de uma determinada substância para 50% das larvas de organismos incrustantes. O EC_{50} (“*half maximal effective concentration*”) reflete a concentração capaz de inibir 50% da fixação das larvas de organismos incrustantes (Cho *et al.* 2012)

Em 2006, Li *et al.* isolaram cinco metabolitos secundários, pertencentes à família das dicetopiperazinas, a partir de *Streptomyces fungicidicus*, figura 1.8.

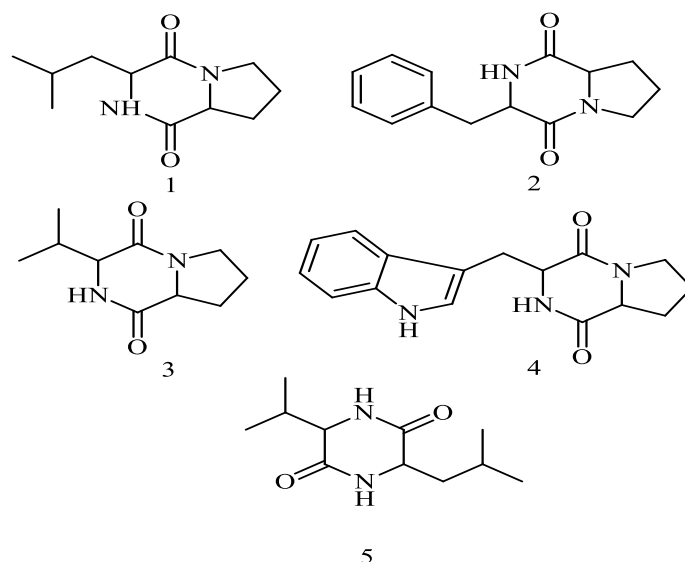


Figura 1.8. Estrutura química de dicetopiperazinas com atividade anti-incrustante isoladas da bactéria *Streptomyces fungicidicus*. Retirada de (Li *et al.* 2006).

Os compostos representados na figura 1.8 inibem a fixação das larvas de *Balanus amphitrite*, destacando-se o composto 3 como o mais promissor, com uma razão terapêutica LC_{50}/EC_{50} superior a 7, sugerindo eficiência a baixas concentrações (Li *et al.* 2006).

Xu *et al.* (2009) demonstraram a capacidade anti-incrustante do composto representado na figura 1.9 isolado a partir de *Streptomyces* de origem marinha.

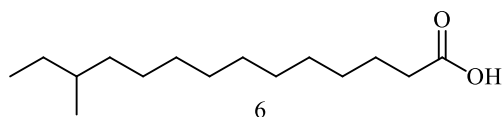


Figura 1.9. Estrutura química do ácido 12-metil-tetradecanóico (12-MTA) obtido de uma estirpe de *Streptomyces*. Retirada de (Xu *et al.* 2009).

Este composto apresenta uma razão terapêutica $LC_{50}/EC_{50} > 130$ indicando a sua poderosa atividade *antifouling* aliada a baixos níveis de toxicidade (Xu *et al.* 2009).

Noutro estudo conduzido pelo mesmo autor, foram isolados cinco compostos estruturalmente semelhantes (7-12, figura 1.10.) a partir de *Streptomyces albidoflavus* (Xu *et al.* 2010).

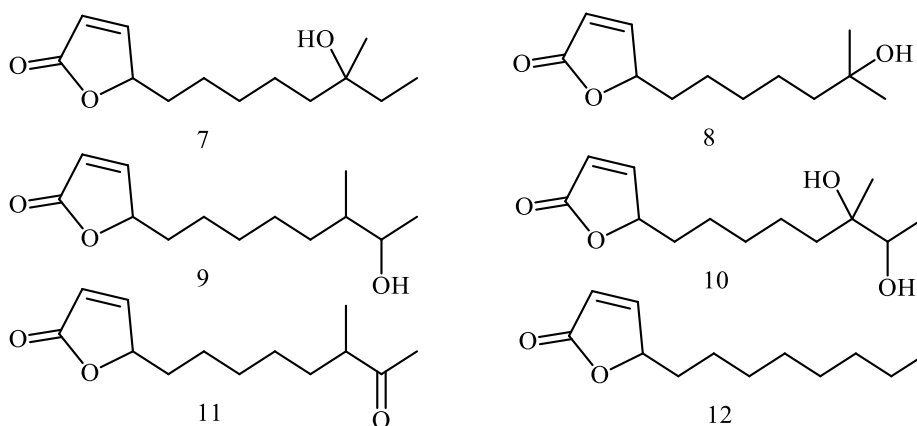


Figura 1.10. Estrutura química dos compostos 7-12, isolados a partir de extratos brutos obtidos de *Streptomyces albidoflavus*. Retirada de (Xu *et al.* 2010).

O facto dos compostos 7-11 apresentarem uma baixa janela terapêutica sugere a morte das cracas da espécie *Balanus* a concentrações reduzidas, impossibilitando a sua incorporação num revestimento anti-incrustante.

Através da avaliação da relação estrutura-atividade dos compostos 7-11, sintetizaram o composto 12 (figura 1.10) que revelou atividade anti-incrustante contra hidróides (*Hydroides elegans*), briozoários (*Bugula neritina*) e cracas (*Balanus amphitrite*) com razões terapêuticas de 97, 119 e 250, respetivamente.

Gopikrishnan & Radhakrishnan (2016) isolaram, purificaram e caracterizaram um composto anti-incrustante obtido a partir de *Streptomyces fradiae*. O composto representado na figura 1.11 pertence à classe dos flavonoides e apresenta atividade anti-*macrofouling* contra algas (*Anabena* sp. e *Nostoc* sp.) e mexilhões (*Perna indica*).

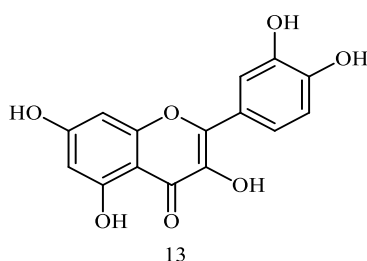




Figura 1.11. Estrutura química da quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona). Retirada de (Gopikrishnan & Radhakrishnan 2016).

O composto 13 inibe 70% da germinação dos esporos das algas em estudo à concentração de 100 µg/ml e inibe 90% da fixação das larvas de mexilhão à mesma concentração (Gopikrishnan & Radhakrishnan 2016).



14



15

A maioria dos compostos apresentados anteriormente apresentaram resultados promissores na inibição da fixação de organismos macro-incrustantes, mas as suas capacidades anti-*microfouling* não foram avaliadas. Estes compostos não foram impregnados num sistema de revestimento, como as tintas, de modo a avaliar a sua eficácia após a incorporação.

Apresenta poderosa atividade *antifouling* contra a fixação de cracas, protegendo a 100% as superfícies submersas.

O facto deste estudo ter comprovado a eficácia anti-cracas da tinta com ivermectina incorporada, não foi comprovada a sua capacidade de proteção contra a fixação de outros grupos taxonómicos como algas e mexilhões. A atividade *microfouling* deste composto não foi testada. Assim, a procura por um revestimento que incorpore um composto com atividade anti-micro e macro-incrustante ainda perdura.

1.6. Contextualização do trabalho e objetivos

Face à crescente preocupação com o meio ambiente, tem vindo a ser sido adotadas medidas de controlo e diminuição da poluição, sendo a indústria naval um dos principais agentes poluentes devido à forte emissão de gases nocivos. A incrustação biológica afeta a performance dos navios, levando à redução da sua velocidade e consequentemente, ao aumento da emissão de gases tóxicos.

O desenvolvimento de um sistema anti-incrustante eficaz e ambientalmente benigno, que não afete organismos não-alvo mas impeça a deposição de organismos marinhos nos cascos das embarcações, é assim uma necessidade premente. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu na identificação de produtos de origem natural com propriedades anti-incrustantes para posterior incorporação num revestimento que confira proteção às embarcações contra a fixação de organismos incrustantes.

A estratégia inicial foi o estudo da atividade anti-biofilme de extratos brutos e de compostos produzidos por actinobactérias marinhas, da espécie *Streptomyces aculeolatus*, contra as bactérias formadoras de biofilme *Cobetia marina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Um composto ativo selecionado previamente foi incorporado numa tinta desprovida de cobre com o intuito de avaliar a sua eficácia anti-*microfouling*. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliação da atividade anti-biofilme de produtos de origem marinha, extratos brutos e compostos naturais, obtidos a partir de actinobactérias;
- Incorporação dos compostos ativos numa tinta sem cobre, com o intuito de desenvolver um revestimento anti-incrustante;
- Desenvolvimento e otimização de um bioensaio para avaliar a eficácia anti-biofilme do revestimento anti-incrustante.

CAPÍTULO 2.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e métodos

2.1. Meios de cultura, soluções e solventes

Todos os meios de cultura referidos neste trabalho foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. A solução de glicerol a 50% foi autoclavada a 110°C durante 20 minutos.

▪ Meio A1: 25% (v/v) de água bidestilada, 75% (v/v) de água do mar filtrada, 1% (m/v) de amido (Becton, Dickinson and Company, França), 0,4% (m/v) de extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company, França), 0,2% (m/v) de peptona (Becton, Dickinson and Company, França), 1,8% (m/v) de agar (meio sólido – LabChem).

▪ Meio marine broth (Carl Roth, Alemanha): 100% (v/v) de água bidestilada, 4% (m/v) de marine broth, 1,5% (m/v) de agar (meio sólido – LabChem).

Violeta de Cristal 0,06% (m/v) - (Sigma Aldrich)

Ácido acético 30% (v/v) - (Sigma Aldrich, $\geq 99,8\%$)

Tabela 2.1. Solventes utilizados e respectivas marcas.

		Marca			Marca
HPLC	Acetato de etilo	Prolabo	Acetato de etilo (extrações)	LABCHEM	
	Iso-octano		THF	Carlo Erba Reagents	
	Metanol		Óleo de linhaça	Royal Talens	
	Água		White spirit	Royal Talens	
	Acetonitrilo		Diluyente	Hempel, SA	
	Acetona	Sigma Aldrich	DMSO	Sigma Aldrich	

2.2. Recolha, processamento dos sedimentos oceânicos e obtenção de amostras – trabalho prévio

O trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação de mestrado realizou-se no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioactivos” (ref.-PTDC/QUI-QUI/119116/2010). As amostras testadas foram obtidas a partir de bactérias gram-positivas, actinobactérias, recolhidas ao largo do arquipélago da Madeira (figura 2.1). O trabalho experimental realizado previamente consistiu, resumidamente, no isolamento e purificação deste tipo de bactérias a partir dos sedimentos oceânicos recolhidos, figura 2.1, para a produção de extratos brutos, frações e compostos.

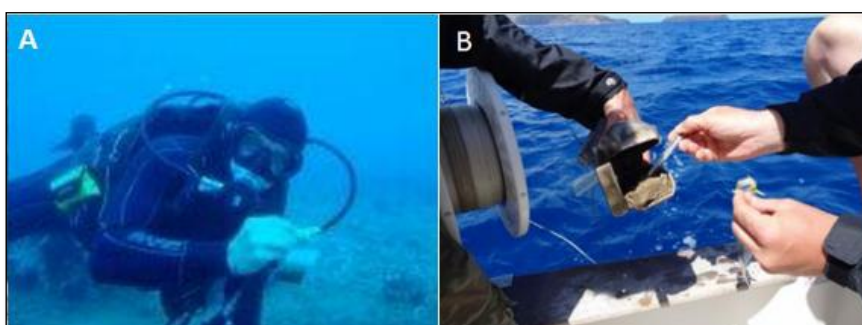
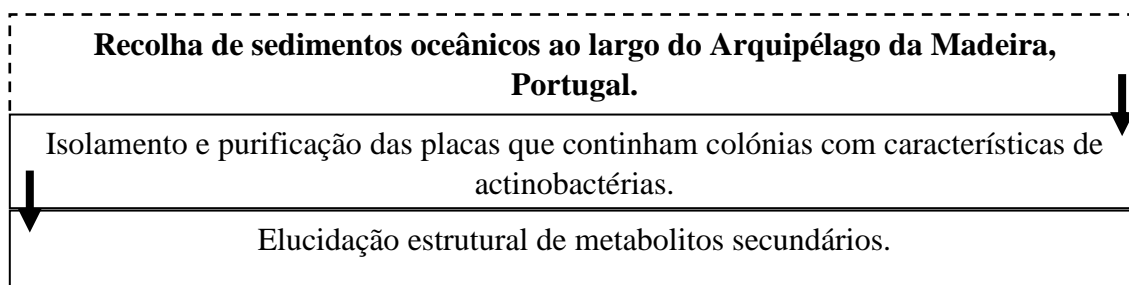


Figura 2.1. Recolha de amostras oceânicas ao largo do arquipélago da Madeira. A: recolha de sedimentos marinhos a baixa profundidade. B: recolha à superfície. Imagens cedidas por S. Gaudêncio.



2.2.1. Amostras provenientes de actinobactérias

2.2.1.1. Obtenção de extratos brutos e compostos

Para obtenção dos extratos brutos procedeu-se ao crescimento da estirpe bacteriana em meio A1. Para tal, inoculou-se 50 mL de meio A1 com 1mL de stock da estirpe bacteriana que produz o extrato bruto de interesse. A cultura foi incubada durante 7 dias a 25°C, com agitação a 120rpm. Após este período, metade do volume de cultura foi transferido para 1L de meio A1, incubado durante 7 dias às mesmas condições.

Os metabolitos secundários libertados para o meio devido à lise das células bacterianas foram extraídos com acetato de etilo. Cada litro de crescimento foi extraído 3x com 500 mL de acetato de etilo. Para tal utilizou-se uma ampola de decantação e agitou-se até ser obtida uma mistura homogênea. Após uma etapa de repouso foi visível a formação de duas fases distintas: a fase orgânica, onde se encontravam os metabolitos secundários, e a fase aquosa.

A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi concentrada utilizando um evaporador rotativo (Brinkmann Büchi Rotavapor, Suíça) atingindo a secura. Este concentrado foi transferido para frascos sendo estes submetidos a secagem sob azoto. De modo a eliminar qualquer vestígio de solvente, os extratos brutos obtidos foram colocados durante aproximadamente 24h sob vácuo. Os extratos brutos foram posteriormente fracionados por cromatografia flash (sílica gel 60 – fase normal, Merk, EUA), utilizando como gradientes de eluição iso-octano:acetato de etilo – 100:0 a 0:100 – seguido de acetato de etilo:metanol – 90:10, 50:50 e 0:100, e as frações separadas em compostos por cromatografia HPLC – “*High performance liquid chromatography*” (Ultimate 3000, Dionex, EUA) - de fase reversa utilizando uma coluna C₁₈, de 100Å de poro (Phenomenex, EUA), com caudal 1,5 mL/min e eluindo com água:acetonitrilo (Prolabo).

2.2.1.2. Extratos brutos e compostos testados neste trabalho

Neste trabalho foram testados 6 extratos brutos isolados do género *Salinispora* e 55 compostos isolados de diferentes estirpes de *Streptomyces aculeolatus* relativamente à capacidade de inibição de formação de biofilme pela bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. No ensaio de atividade anti-biofilme com a bactéria *Cobetia marina*, foram apenas testados 51 compostos. Na tabela 2.2 e 2.3 encontram-se os códigos dos extratos brutos e dos compostos que foram testados relativamente às suas atividade anti-biofilme. A negrito encontram-se destacados os compostos que não foram testados relativamente à capacidade de inibição de formação de biofilme da bactéria *Cobetia marina*.

Tabela 2.2. Lista dos extratos brutos testados nesta dissertação isolados de *Salinispora*.

Referência dos extratos brutos	
PTM 89	PTM 227
PTM 98	PTM 305
PTM 99	PTM 356

Tabela 2.3. Lista dos compostos testados neste trabalho pertencentes à mesma espécie, *Streptomyces aculeolatus*, mas a estirpes diferentes: PTM-29, PTM-81, PTM-346, PTM-420.

PTM-29 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	
Fração 2	F20, F29
Fração 3	F48, F54, F61
Fração 4	F33, F39
Fração 5	F18 , F25, F34, F39, F41
Fração 6	F26, F30, F31, F33, F35, F38, F41, F45, F48, F55, F56, F58
Fração 7	F19, F27, F32
PTM-81 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	
Fração 2+3	F52, F54, F57, F66, F69, F71
Fração 5+6	F54 , F57, F63, F65
PTM-346 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	
Fração 4	F25 , F31, F34, F39, F41, F42, F45
Fração 6	F37
PTM-420 <i>Streptomyces aculeolatus</i>	
Fração 2+3	F12, F18, F20, F22, F25, F27, F35, F39
Fração 4	F15, F25

As amostras testadas neste trabalho foram resuspendidas em DMSO – dimetil sulfóxido (Sigma Aldrich $\geq 99,9\%$), um solvente polar aprótico que não compromete o ensaio biológico devido à sua baixa toxicidade para células bacterianas, a uma concentração de 10 mg/mL. Para os ensaios biológicos com extratos brutos, procedeu-se a diluições seriadas em DMSO de modo a obter as seguintes concentrações, em µg/mL: 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98.

Relativamente ao ensaio biológico com compostos naturais, as concentrações utilizadas tomam valores iguais ou inferiores a 31,25 µg/mL.

2.3. Trabalho realizado nesta dissertação

2.3.1. Estirpes de bactérias marinhas formadoras de biofilme

No presente trabalho utilizaram-se as bactérias marinhas *Cobetia marina* (DSMZ 4741) e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (DSMZ 8798), obtidas a partir da coleção de culturas do Leibniz Institute DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*.

2.3.1.1. Condições de crescimento bacteriano das estirpes bacterianas formadoras de biofilme

As bactérias *Cobetia marina* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* foram sempre propagadas em marine broth líquido ou sólido. Ambas as espécies bacterianas foram reavivadas a partir do liofilizado original e posteriormente criopreservadas em alíquotas a -80°C com glicerol a 50%.

A cultura inicial foi obtida a partir do stock criopreservado através da imersão de uma ansa estéril na suspensão bacteriana descongelada de modo a transferir bactérias para placas de Petri com marine broth sólido. As culturas foram incubadas a 28°C durante 2 dias e posteriormente utilizadas para inocular marine broth líquido filtrado com colónias isoladas. A cultura líquida foi incubada a 28°C, com agitação a 180 rpm para arejamento (ON, 16 horas).

2.3.1.2. Monitorização do crescimento das culturas bacterianas

A monitorização do crescimento bacteriano foi realizada por leitura da densidade ótica a 595 nm (OD_{595nm}) de alíquotas de cultura das espécies em estudo, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e *Cobetia marina*, utilizando um espectrofotómetro UV/Vis Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, Inglaterra).

Um volume de 5mL de marine broth filtrado foi inoculado com as bactérias acima referidas e mantido a 28°C, ON, sob agitação a 180 rpm (pré-inóculo). A OD_{595nm} da cultura de pré-inóculo foi determinada e a cultura diluída de forma a obter um valor de OD_{595nm} de 0,02.

As culturas foram incubadas a 28°C, sob agitação a 180 rpm, e os valores de OD_{595nm} foram registados de 30 em 30 minutos. Este processo foi realizado até ser atingida a fase estacionária de crescimento.

2.3.2. Ensaio da atividade anti-biofilme

As estirpes bacterianas formadoras de biofilme foram inoculadas em marine broth líquido e incubadas a 28°C, com agitação a 180 rpm, ON. Ao fim deste período, procedeu-se à leitura da OD_{595nm} da cultura bacteriana utilizando-se um espectrofotómetro (Ultrospec 3100 Pro, Amersham Biosciences, Inglaterra). Seguidamente, a cultura bacteriana foi diluída para um valor de OD_{595nm} inicial de 0,2. Um volume de 200 µL de cultura foi adicionado a cada poço de uma placa de 96 poços estéreis (Nunc)

Delta Surface, Thermo Scientific, Dinamarca) e posteriormente foram acrescentados diferentes volumes da amostra a testar aos poços da microplaca. Cada concentração foi testada em triplicado e os controles em duplicado, por uma questão de organização de espaço na microplaca. Os controles referem-se ao meio de cultura estéril (marine Broth), meio de cultura inoculado com as estirpes bacterianas em teste na ausência de amostra e meio de cultura inoculado com as estirpes bacterianas na presença de 5% DMSO.

As placas foram incubadas ON à temperatura de 28°C, sem agitação. Após a incubação determinou-se o valor de OD_{595nm} associado a cada poço da microplaca de modo a obter valores relativos ao crescimento bacteriano. As células não aderentes, bem como o meio de cultura, foram rejeitados por inversão da placa sendo esta lavada duas vezes, cuidadosamente, com água bidestilada.

Para a fixação do biofilme que se formou à superfície do poço, as microplacas foram incubadas a 60°C durante uma hora. Posteriormente, foi adicionada a cada poço uma solução de violeta de cristal (Sigma Aldrich, 90%) a 0,06% (p/v) e a placa foi incubada à temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. O corante em excesso foi removido e a placa foi novamente lavada com água desionizada. Os biofilmes depositados nos poços da microplaca foram ressuspensos em 200µL de ácido acético (Sigma, ≥99,8%) 30% e os valores de OD_{595nm} foram determinados utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190). Diluições de 1:10 em 30% de ácido acético foram efetuadas quando valores de OD_{595nm} ≥ 2,5 eram obtidos.

Os valores de densidades óticas registados ao longo do ensaio foram tratados estatisticamente para a obtenção de percentagens de inibição de crescimento bacteriano e de inibição de formação de biofilme. O erro padrão da média foi calculado de modo a estimar a variabilidade entre os valores obtidos.

2.3.3. Desenvolvimento e otimização de novo ensaio anti-microincrustante

De modo a avaliar a atividade anti-*microfouling* do sistema tinta-composto foi necessário desenvolver e otimizar um novo bioensaio.

Para tal foram utilizadas três tintas fornecidas pela Hempel® com diferentes formulações: Hempel Antifouling Olympic, Hempel Antifouling Classic e Hempel Classic sem cobre. As tintas Hempel Antifouling Olympic e Hempel Antifouling Classic apresentam atividade anti-incrustante comprovada contra organismos macro-incrustantes. Estas duas formulações de tintas diferem apenas na quantidade de cobre e no tipo de matriz que as compõe. A tinta Hempel Classic sem cobre foi desenvolvida exclusivamente pela Hempel® para este trabalho.

Hempel Antifouling Olympic

Tinta anti-incrustante auto-polimetante e com elevado teor de sólidos (volume de sólidos: 50%). Este produto não contém compostos de organoestanho atuando como biocidas e está em conformidade com a International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships, adotada pela IMO em 2001. O fato de ser uma tinta autopolimetante permite a libertação controlada do biocida ao longo do tempo, aumentando o seu tempo de meia-vida (<http://www.hempel.pt/pt-PT/products/hempels-antifouling-olympic-86950><http://www.hempel.pt/pt-PT/products/hempels-antifouling-olympic-86950> consultado em 6-7-16).

Hempel Antifouling Classic

Tinta anti-incrustante do tipo "matriz solúvel" e com elevado teor de sólidos (volume de sólidos: 56%). Este produto não contém compostos de organoestanho atuando como biocidas e está em conformidade com a International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships, adotada pela IMO em 2001 (<http://www.hempel.pt/pt-PT/products/hempels-antifouling-classic-76110> consultado em 6-7-16).

Hempel Classic sem cobre

Tinta anti-incrustante com formulação idêntica à tinta referida anteriormente à exceção da ausência de biocidas na sua composição.

Nova formulação de tinta desenvolvida neste trabalho

Para além das tintas acima descritas, uma nova formulação foi desenvolvida. Foi adicionado um composto comercial à tinta Hempel Classic sem cobre, isolado da bactéria *Bacillus pumilus* que apresenta atividade anti-biofilme contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, figura 2.2 (Nithya *et al.* 2011).

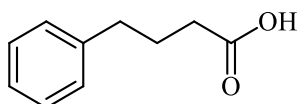


Figura 2.2. Estrutura química do composto ácido 4-fenilbutanóico. Retirada de (Nithya *et al.* 2011).

2.3.3.1. Ensaio *antifouling* com pins revestidos

A estratégia inicial para avaliar a capacidade *antifouling* das tintas descritas baseava-se na utilização de pins flutuantes que simulavam os cascos dos navios. As esferas dos pins (3,74 mm) foram pintadas com diferentes formulações de tinta e posteriormente mergulhadas em cultura bacteriana de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

O composto comercial ácido 4-fenilbutanóico foi adicionado a diferentes concentrações na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre: 5 µg/mL, 20, 40 µg/mL, 60, 80 e 100 µg/mL.

Após a preparação das formulações de tinta necessárias para o ensaio, procedeu-se à pintura dos pins flutuantes e à sua secagem à chama durante aproximadamente 6h garantindo condições de esterilidade durante o processo, figura 2.3.

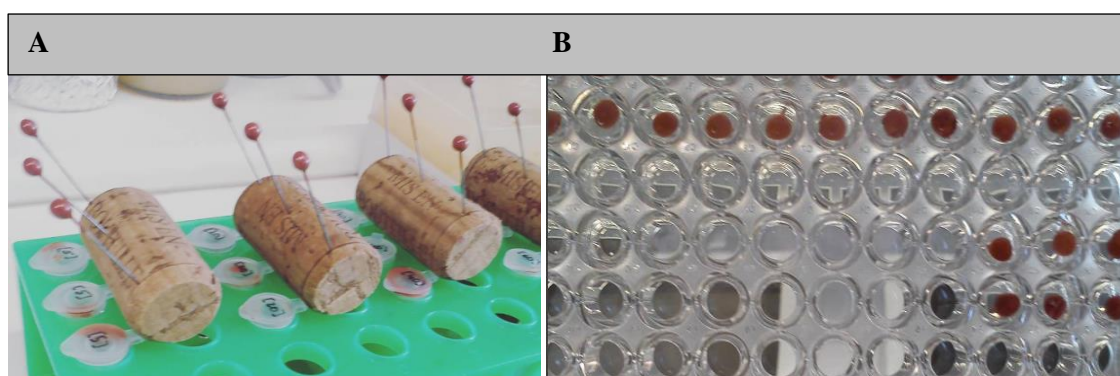


Figura 2.3. Ensaio *antifouling* utilizando pins flutuantes mergulhados em cultura bacteriana. A: processo de secagem dos pins flutuantes à temperatura ambiente e à chama. B: pins flutuantes colocados em poços de uma microplaca de 96 poços.

Posteriormente, os pins foram cortados utilizando um alicate de corte para separar a esfera do restante material do alfinete e colocados individualmente em cada poço da microplaca preenchidos com 200 µL de cultura bacteriana. Após incubação a 28°C ON sem agitação, foi quantificado o crescimento bacteriano e o biofilme formado à superfície do pin como descrito no ponto 2.3.2.

2.3.3.2. Ensaio *antifouling* através da pintura de placas de 96 poços

Esta metodologia baseou-se na pintura de poços de uma microplaca de 96 poços com as diferentes formulações de tintas já mencionadas: Hempel Antifouling Olympic, Hempel Antifouling Classic, Hempel Classic sem cobre e Hempel Classic sem cobre contendo ácido 4-fenilbutanóico nas concentrações de 0,1%, 1% e 5%.

Para o desenvolvimento da tinta Hempel Antifouling Classic com ácido 4-fenilbutanóico foi necessário recorrer a diferentes solventes de modo a obter a total dissolução do composto. Assim, foram

testados os seguintes solventes: metanol, acetato de etilo, acetona, *white spirit*, óleo de linhaça, diluente e tetrahidrofurano.

Os poços da microplaca foram pintados com uma micropipeta de 1000 µL e a placa foi seca durante 24h à temperatura ambiente, figura 2.4. Posteriormente esterilizou-se a microplaca durante 30 minutos utilizando para o processo uma lâmpada ultravioleta (VL 215-C, Vilbert Lourmand). Foram feitos triplicados para cada formulação de tinta e um poço adicional para controle.

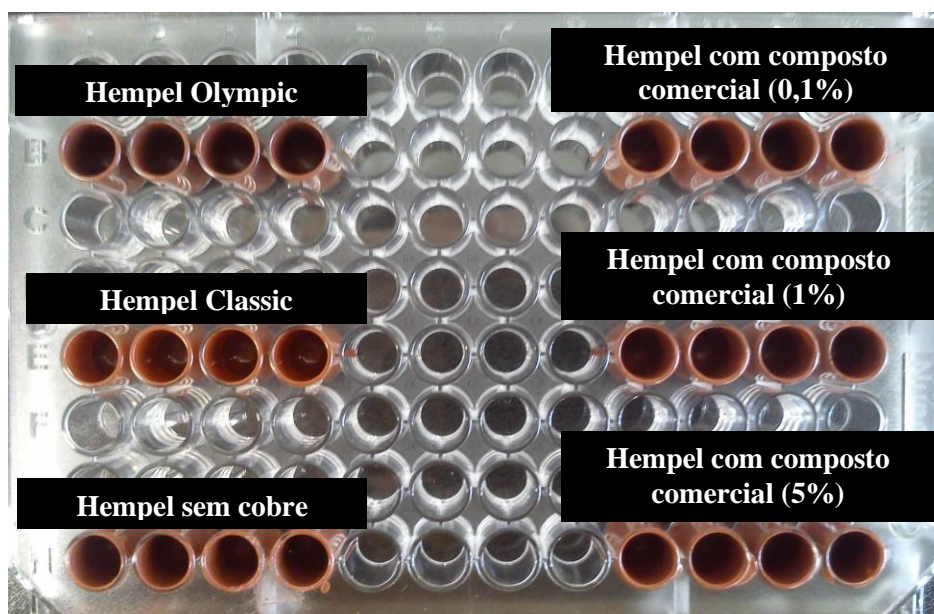


Figura 2.4. Esquema da microplaca de 96 poços pintada com as diferentes formulações de tinta antes da adição de cultura bacteriana de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Após a secagem dos poços e da sua esterilização foi adicionada cultura bacteriana de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a OD_{595nm} de 0,2. A microplaca foi incubada à temperatura de 28°C e sem agitação. Foram testados três diferentes tempos de incubação, dois dias, uma semana e um mês de modo a avaliar a influência do tempo na taxa de libertação do biocida para o meio.

No final do período de incubação procedeu-se à quantificação da inibição do crescimento bacteriano e da inibição de formação de biofilme como descrito anteriormente.

2.3.3.3. Ensaio *antifouling* através da pintura de placas de Petri

Para o desenvolvimento deste ensaio anti-incrustante utilizaram-se placas de Petri de 5,5 cm de diâmetro. Estas foram previamente pintadas com 5 mL de cada uma das seis tintas em estudo e secas à temperatura ambiente. As concentrações de ácido 4-fenilbutanóico incorporadas na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre foram as mesmas que as utilizadas no ensaio anterior: 0,1%, 1% e 5%.

Foram realizados triplicados para cada formulação de tinta em teste e as placas foram esterilizadas durante 30 minutos recorrendo a radiação UV, figura 2.5.

Após o período de esterilização foram adicionados 5mL de cultura bacteriana *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a cada placa de Petri sendo estas posteriormente incubadas a 28°C sem agitação. Neste bioensaio foram testados dois períodos de incubação: uma semana e um mês. O processo de quantificação do biofilme formado foi feito pela sua coloração com 1,25mL de violeta de cristal e com 5mL de ácido acético.

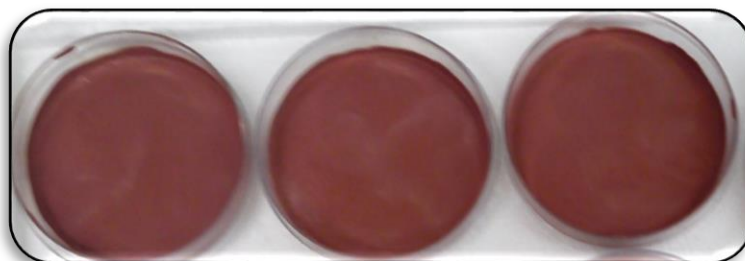


Figura 2.5. Placas de Petri pintadas com a tinta Hempel Antifouling Classic antes da adição de cultura bacteriana de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

2.3.4. Avaliação do efeito *anti-microfouling* de uma nova formulação de tinta com produtos naturais

De modo a avaliar a capacidade anti-incrustante de um composto com atividade anti-biofilme contra a bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, este foi incorporado numa tinta isenta de biocidas: Hempel Classic sem cobre. O composto PTM 420, F2+3, F22, pertencente à família das napiradiomicinas, foi adicionado às concentrações de 0,1% e 1% a 200 µl de tinta. A concentração de 5% não foi testada devido a limitações na quantidade de composto disponível. Este composto foi isolado e elucidado no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioativos”, figura 2.6.

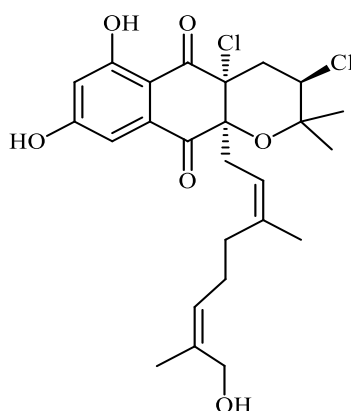


Figura 2.6. Estrutura química do composto PTM-420, F2+3, F22 pertencente à família das napiradiomicinas. Retirada de (Motohashi, K. *et al.* 2008).

A superfície da placa de Petri foi pintada com um pincel de modo a cobrir toda a base da placa uniformemente. Neste ensaio também se pintaram placas de Petri com as tintas: Hempel Antifouling Olympic, Hempel Antifouling Classic e Hempel Classic sem cobre.

Após um período de secagem de aproximadamente 12h à temperatura ambiente, as placas foram esterilizadas durante 30 minutos sob radiação UV. A cada placa foram adicionados 5mL de cultura bacteriana de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sendo estas mantidas a 28°C, sem agitação, durante uma semana. No final deste tempo, procedeu-se à quantificação do crescimento bacteriano através da leitura da OD_{595nm} de 200 µL de meio.

Posteriormente descartou-se a restante quantidade de meio de cultura disponível em cada placa de Petri sendo estas lavadas 2x com água bidestilada. Para a fixação do biofilme que se tenha desenvolvido na superfície, as placas foram incubadas durante 1h a 60°C sendo adicionados a cada uma delas 1,25 ml de violeta de cristal de modo a corar o biofilme.

Ao fim de 10 minutos, descartou-se o corante, lavaram-se novamente as placas 2x em água bidestilada e adicionaram-se 5mL de ácido acético.

A quantificação do biofilme foi feita através da leitura da OD_{595nm} de 200 µl da mistura presente em cada placa de Petri.

CAPÍTULO 3.

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nesta dissertação foi avaliada a atividade anti-biofilme de extratos brutos isolados de *Salinispora* e compostos naturais isolados de diferentes estirpes de *Streptomyces aculeolatus*. Para a avaliação da atividade anti-biofilme dos produtos provenientes de actinobactérias marinhas, escolheram-se duas bactérias marinhas formadoras de biofilme, *C. marina* e *M. hydrocarbonoclasticus*, utilizadas anteriormente como modelos bacterianos em estudos anti-incrustantes, como referenciam Ekblad *et al.* (2008) e Souza *et al.* (2010).

3.1. Perfil de crescimento das culturas bacterianas

De modo a obter o perfil de crescimento das bactérias em estudo, a densidade ótica das culturas foi monitorizada durante cerca de 10,5h. Na figura 3.1 encontra-se representado o perfil de crescimento para cada uma das bactérias mencionadas.

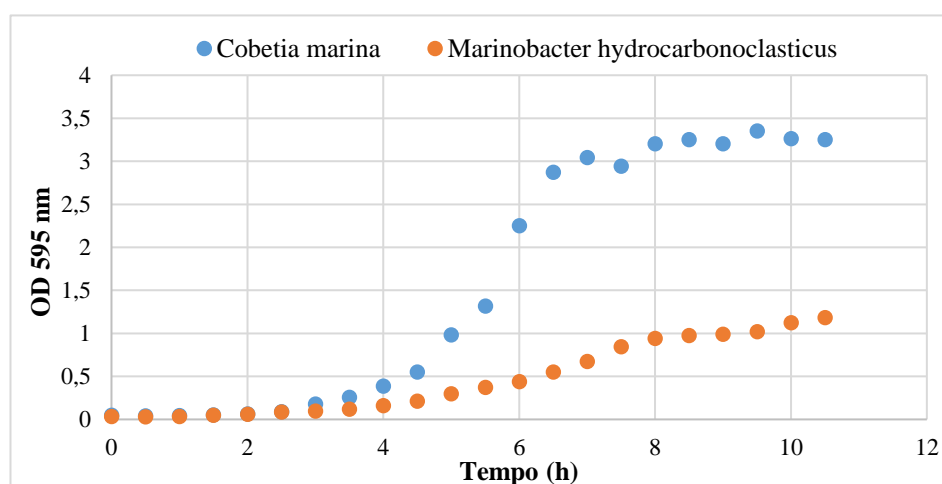


Figura 3.1. Perfil de crescimento das bactérias formadoras de biofilme utilizadas neste trabalho. Representação da OD_{595 nm} em função do tempo de crescimento (horas).

Tabela 3.1. Taxa específica de crescimento e tempo de geração das bactérias em estudo.

Espécie bacteriana	Taxa específica de crescimento (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	0,3904	1,7754
<i>Cobetia marina</i>	0,8326	0,8325

Através da análise da figura 3.1 podemos constatar que o perfil de crescimento foi distinto para as duas estirpes em estudo. O perfil de crescimento da bactéria *C. marina* apresenta três fases características – fase *lag*, exponencial e estacionária, sendo que a fase de morte não foi atingida no tempo de realização do ensaio.

A fase de adaptação às condições do meio - fase *lag* - teve a duração de 3,5h (0 - 3,5h), a fase exponencial de 3h (3,5 - 6,5h) e a fase estacionária de 3,5h (7 - 10,5h). Em contraste, o perfil de crescimento da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* apresentou apenas duas fases de crescimento: a fase *lag* e a fase exponencial. A fase *lag* teve a duração de 4h (0 – 4h) seguindo-se a fase exponencial com uma duração de 6,5h (4 – 10,5h). A fase estacionária e a fase de morte não foram atingidas durante o ensaio. Em concordância, a taxa de crescimento mais elevada foi a de *C. marina* ($0,8326\text{ h}^{-1}$) correspondente a um menor tempo de geração (0,8325 h).

A taxa de crescimento de *M. hydrocarbonoclasticus* foi de $0,3904\text{ h}^{-1}$, o tempo de geração de 1,7754 h, o que significa que esta bactéria apresenta, nas condições testadas, um crescimento mais lento do que *C. marina*.

3.2. Resultados da atividade anti-biofilme das amostras testadas

Neste trabalho foram testados seis extratos brutos, tabela 2.2, relativamente à sua capacidade de inibição de formação de biofilme pelas bactérias marinhas *C. marina* e *M. hydrocarbonoclasticus*.

Os resultados mais promissores apresentam valores de inibição do crescimento bacteriano inferiores ou iguais a 40% e uma inibição de formação de biofilme marinho superior ou igual a 80% (Kwasny and Opperman 2010). A escolha destes valores limite deve-se ao facto de ser necessário garantir que a percentagem de inibição de formação de biofilme se deve apenas à capacidade do composto em inibir especificamente a formação de biofilme e não à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano.

Os resultados das percentagens de inibição do crescimento bacteriano para cada uma das estirpes utilizadas bem como as percentagens de inibição de formação de biofilme para cada um dos extratos brutos testados encontram-se discriminados seguidamente nas tabelas 3.2 e 3.3. Foram apenas mencionadas as concentrações às quais se obteve a melhor relação entre um valor elevado de inibição de formação de biofilme e um valor reduzido de inibição de crescimento.

Tabela 3.2. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme pela bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* de seis extratos brutos isolados de actinobactérias marinhas da espécie *Salinispora* sp. Encontram-se apenas representadas as concentrações que demonstraram maiores percentagens de inibição de formação de biofilme. (N.I.-Não inibe).

Referência do extrato bruto	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (%)	Inibição de formação de biofilme (%)
PTM-89	15,62	N.I.	35,3 ± 5,0
PTM-98	31,25	N.I.	38,7 ± 14,9
PTM-99	7,81	N.I.	43,0 ± 4,6
PTM-227	125,00	N.I.	35,0 ± 8,8
PTM-305	62,50	N.I.	29,6 ± 21,4
PTM-356	0,98	N.I.	54,0 ± 4,0

Os resultados de inibição obtidos para os seis extratos brutos testados não foram positivos, visto que, apesar dos extratos não inibirem o crescimento bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, também não apresentaram atividade de inibição de formação de biofilme.

O extrato PTM-356 apresentou valores de inibição de formação de biofilme acima de 50%, sendo que o gráfico correspondente se encontra representado na figura 3.2.

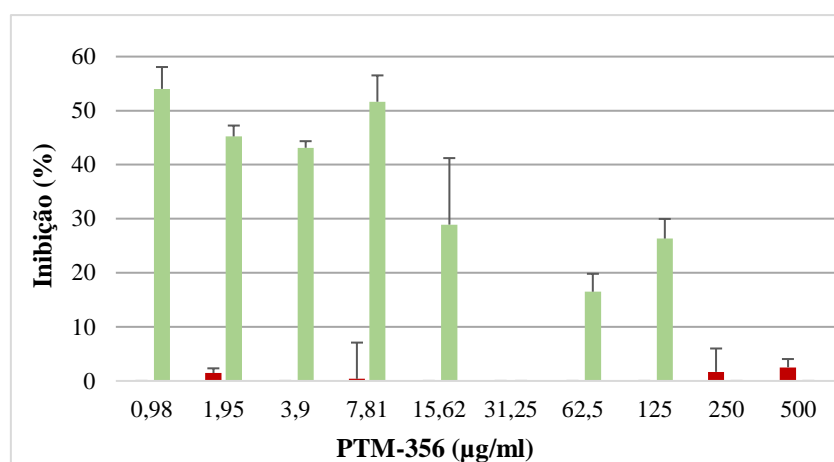


Figura 3.2. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* para o extrato bruto PTM-356, *Salinispora* sp. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão para cada concentração testada.

Tabela 3.3. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme pela bactéria *C. marina* de seis extratos brutos isolados de actinobactérias marinhas da espécie *Salinispora* sp. Encontram-se apenas representadas as concentrações que demonstraram maiores percentagens de inibição de formação de biofilme. (N.I.-Não inibe).

Referência do extrato bruto	Concentração (µg/ml)	Inibição do crescimento (%)	Inibição de formação de biofilme (%)
PTM-89	7,810	N.I.	19,9 ± 14,1
PTM-98	500	N.I.	24,2 ± 10,6
PTM-99	0,98	N.I.	39,5 ± 4,8
PTM-227	62,50	14,8 ± 2,6	46,7 ± 5,9
PTM-305	31,25	N.I.	42,3 ± 6,9
PTM-356	7,81	N.I.	43,8 ± 5,5

Através da análise da tabela 3.3 podemos constatar que os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme para a bactéria *C. marina* foram ligeiramente diferentes dos obtidos para a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*. A percentagem mais elevada de inibição de formação de biofilme foi de 46,7% para uma concentração de extrato bruto de 62,5 µg/mL correspondente ao extrato PTM-227. O gráfico que relaciona as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as concentrações de extrato bruto PTM-227 testadas encontra-se representado na figura 3.3.

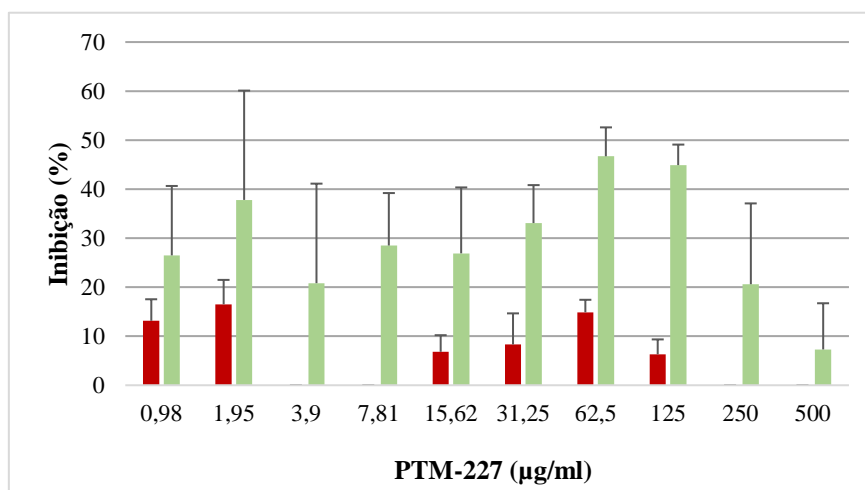


Figura 3.3. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria *C. marina* para o extrato bruto PTM-227, *Salinispora* sp. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão para cada concentração testada.

Apesar dos extratos brutos testados para ambas as estirpes apresentarem uma inibição da atividade antibacteriana abaixo dos 40%, um dos requisitos essenciais para serem considerados produtos naturais promissores, não demonstram uma forte inibição de formação de biofilme das duas bactérias

utilizadas no estudo. Assim sendo, não será realizado o seu fracionamento, nem a separação das frações em compostos naturais, uma vez que se o extrato bruto não apresenta atividade biológica favorável, os compostos naturais que o compõe têm baixas probabilidades de apresentar atividades que preencham os requisitos necessários para serem utilizados como compostos anti-biofilme.

Os 55 compostos discriminados na tabela 2.3 apresentam atividade anti-macroincrustação contra larvas de mexilhão da espécie *Mytilus galloprovincialis* em ensaios biológicos realizados no CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Porto.

Destes 55 compostos naturais, apenas 51 foram testados relativamente à capacidade de inibição de formação de biofilme da bactéria *C. marina*. O composto PTM-29, F6, F41 apresentou os melhores resultados de inibição, inibindo o crescimento em 19,6% e a formação de biofilme em 78,1%, figura 3.4.

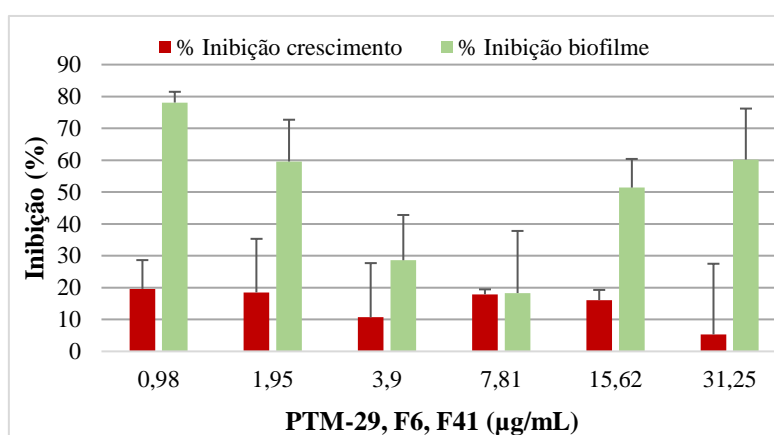


Figura 3.4. Percentagem de inibição de crescimento e de inibição de formação de biofilme pela bactéria *C. marina*. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão associados para cada concentração testada.

Sendo este o único composto que apresentou atividade anti-biofilme contra a bactéria *C. marina*, com percentagens de inibição de formação de biofilme de 78,1% à concentração de 0,98 µg/mL, o ensaio da avaliação da atividade anti-incrustante dos compostos muito ativos apenas envolveu a bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* pelo facto de se terem descoberto seis compostos com atividades promissoras de inibição de formação de biofilme.

Dos 55 compostos utilizados no ensaio anti-biofilme com a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, 12 apresentaram resultados positivos em termos de inibição de formação de biofilme, podendo ser divididos em grupos:

1. compostos que preenchem os requisitos de inibição de crescimento $\leq 40\%$ e inibição de formação de biofilme $\geq 80\%$, sendo designados por “compostos muito ativos”;
2. compostos que apresentam resultados próximos dos valores limite, sendo designados por “compostos ativos”.

1

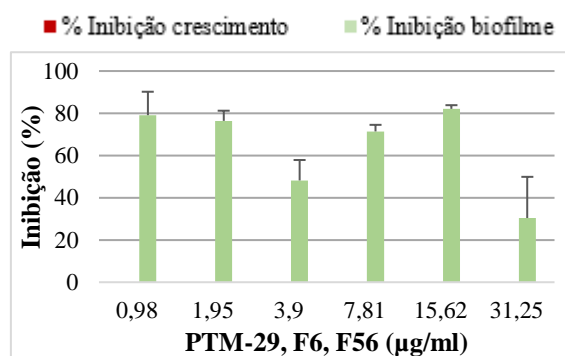
Resultados da atividade anti-biofilme dos compostos muito ativos

Na tabela 3.4 encontram-se discriminados os resultados de inibição de crescimento e inibição de formação de biofilme de seis compostos muito ativos. Os compostos pertencem a diferentes estirpes de *Streptomyces aculeolatus*: PTM-29, PTM-81, PTM-346 e PTM-420.

Tabela 3.4. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, dos compostos muito ativos. Encontram-se apenas apresentadas as concentrações que demonstraram maiores percentagens de inibição e os erros padrão de cada uma delas. (N.I.-Não inibe).

Código composto natural	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição do crescimento (%)	Inibição de formação de biofilme (%)
PTM 29, F6, F56	15,62	N.I.	$82,1 \pm 1,7$
PTM 81, F5+6, F63	7,81	N.I.	$86,9 \pm 2,8$
PTM 81, F5+6, F65	0,98	N.I.	$80,1 \pm 1,4$
PTM 346, F4, F31	0,98	N.I.	$80,0 \pm 7,9$
PTM 346, F4, F42	3,90	N.I.	$81,7 \pm 6,2$
PTM 420, F2+3, F22	3,90	N.I.	$84,4 \pm 4,0$

Os gráficos correspondentes a cada composto, que relacionam as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as concentrações testadas encontram-se representados na figura 3.5.



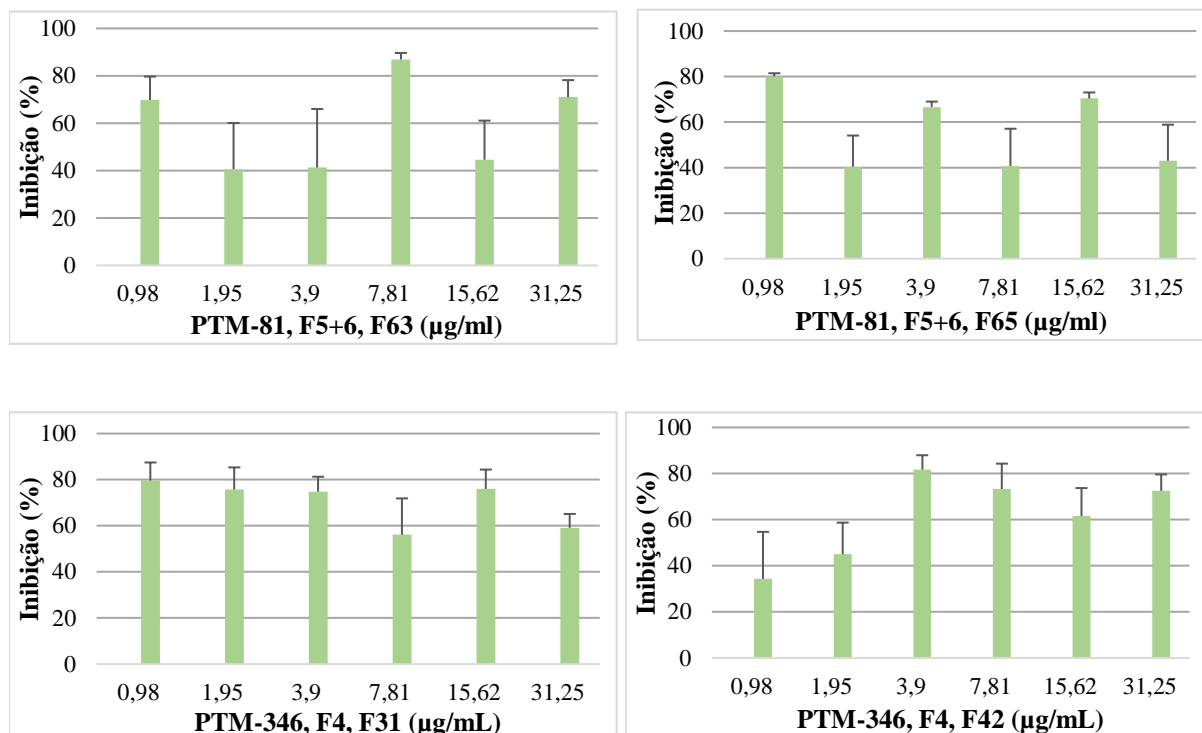


Figura 3.5. Atividade anti-biofilme dos compostos naturais muito ativos: PTM-29, F6, F56; PTM-81, F5+6, F63; PTM-81, F5+6, F65; PTM-346, F4, F31 e PTM-346, F4, F42. Cada gráfico relaciona as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as diferentes concentrações de composto testadas.

Todos os compostos apresentados na figura 3.5 preenchem os requisitos já mencionados, ou seja, apresentam uma inibição de crescimento inferior ou igual a 40%, que nestes casos correspondem a um valor de inibição nula para todas as concentrações testadas e apresentam uma inibição de formação de biofilme com valores superiores ou iguais a 80% para pelo menos uma das concentrações testadas.

Na figura 3.6, o gráfico relaciona as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* com as concentrações testadas do composto PTM-420, F2+3, F22.

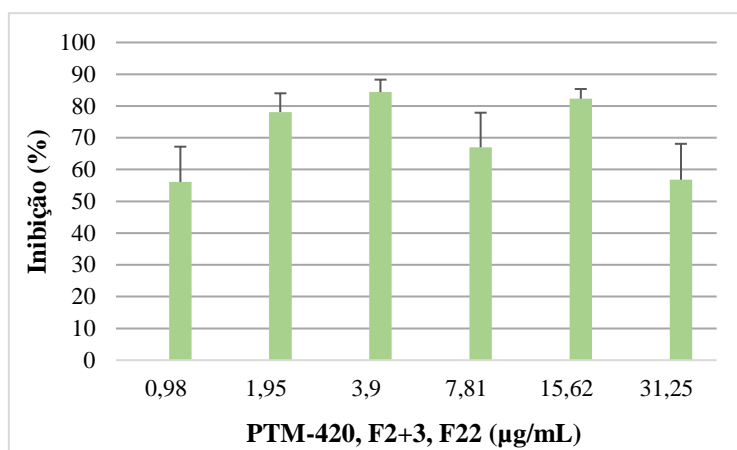


Figura 3.6. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme pela bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* para o composto natural PTM-420, F2+3, F22. Estão representados os valores médios (n=3) e os respectivos erros padrão associados para cada concentração testada.

O composto PTM-420, F2+3, F22 apresenta uma atividade de inibição de formação de biofilme de 84,4% para uma concentração de 3,90 µg/mL. Apesar do composto PTM-81, F5+6, F63 ter uma atividade de inibição de formação de biofilme análoga, este resultado foi obtido a uma concentração superior, de 7,81 µg/mL, permitindo que o composto natural da estirpe PTM-420 se destaque como o composto mais promissor em termos de atividade anti-biofilme.

2

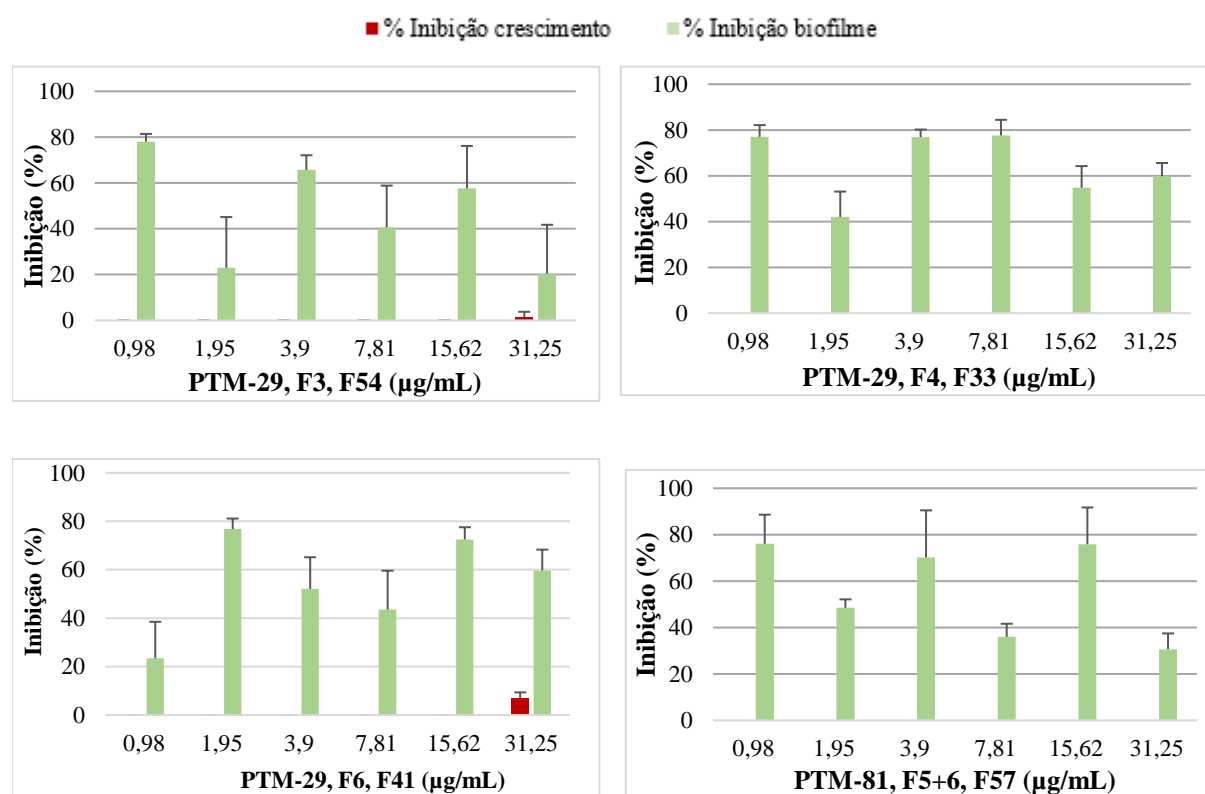
Resultados da atividade anti-biofilme de compostos ativos

Na tabela 3.5 encontram-se discriminados os resultados de inibição de crescimento e inibição de formação de biofilme de compostos ativos. Os compostos pertencem a diferentes estirpes de *Streptomyces aculeolatus*: PTM-29, PTM-81 e PTM-420.

Tabela 3.5. Resultados da capacidade de inibição de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus*, dos compostos ativos. Encontram-se apenas representadas as concentrações que demonstraram maiores percentagens de inibição da formação de biofilme bem como os respetivos erros associados. N.I.-Não inibe.

Código composto natural	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (%)	Inibição da formação de biofilme (%)
PTM 29, F3, F54	0,98	N.I.	78,0 ± 3,4
PTM 29, F4, F33	7,81	N.I.	77,6 ± 6,9
PTM 29, F6, F41	1,95	N.I.	76,8 ± 4,3
PTM 81, F5+6, F57	15,62	N.I.	76,0 ± 6,8
PTM 420, F2+3, F12	1,95	N.I.	77,9 ± 5,2
PTM 420, F2+3, F18	0,98	N.I.	75,7 ± 3,2

Na figura 3.7 encontram-se representados os gráficos que relacionam as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as concentrações dos compostos naturais mencionados anteriormente.



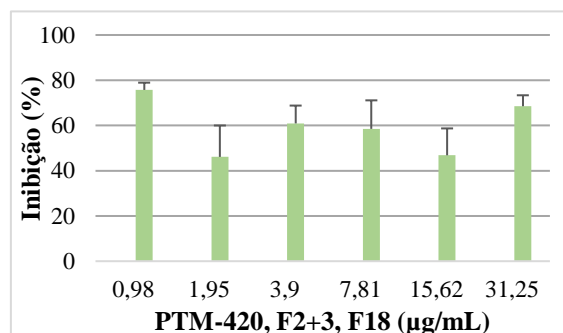


Figura 3.7. Atividade anti-biofilme dos compostos naturais ativos: PTM-29, F3, F54; PTM-29, F4, F33; PTM-81, F5+6, F57; PTM-420, F2+3, F12; PTM-420, F2+3, F18 e PTM-420, F2+3, F39. Cada gráfico relaciona as percentagens de inibição de crescimento bacteriano e de formação de biofilme com as diferentes concentrações de composto testadas.

Através da análise da figura 3.7 podemos verificar que, para todos os compostos, não há inibição do crescimento às concentrações de composto natural testadas, provando que estes compostos se enquadram dentro de um dos requisitos para serem considerados bons agentes anti-biofilme. Contudo, nenhum deles exibe percentagens de inibição de formação de biofilme com valores superiores ou iguais a 80%, fazendo com que se enquadrem dentro da segunda classe de compostos anti-biofilme.

O composto PTM-420, F2+3, F12 destaca-se dos restantes, figura 3.7, por apresentar uma percentagem de inibição de biofilme com valores bastante próximos de 80%, figura 3.8.

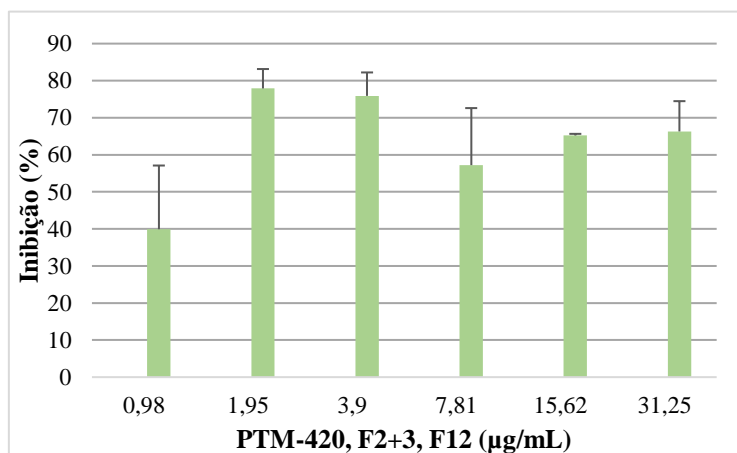


Figura 3.8. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme por *M. hydrocarbonoclasticus* para o composto natural PTM-420, F2+3, F12. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão associados para cada concentração testada.

Apesar do composto PTM-29, F3, F54 apresentar atividade anti-biofilme de 78% à concentração de 0,98 µg/mL, ao contrário do composto ilustrado na figura 3.8 que exibe essa percentagem à concentração de 1,95 µg/mL, as restantes concentrações testadas do composto PTM-29, F3, F54 apresentam atividades de inibição de formação de biofilme mais baixas, levando a que o composto PTM-420, F2+3, F12 seja classificado como o melhor dentro desta classe de compostos ativos.

Os resultados dos restantes compostos testados relativamente à inibição de crescimento e de formação de biofilme, que apresentaram resultados fora dos limites estabelecidos não apresentando atividade desejada, encontram-se representados no anexo 1.1 e 1.2.

3.3. Ensaios da atividade anti-*microfouling*: desenvolvimento e otimização

3.3.1. Atividade anti-*microfouling* do composto ácido 4-fenilbutanóico

Antes de se dar início ao desenvolvimento e otimização do ensaio anti-incrustante foi avaliada a atividade anti-biofilme do composto ácido 4-fenilbutanóico contra a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*. Na figura 3.9 encontra-se representado um gráfico que relaciona as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme para o composto ácido 4-fenilbutanóico.

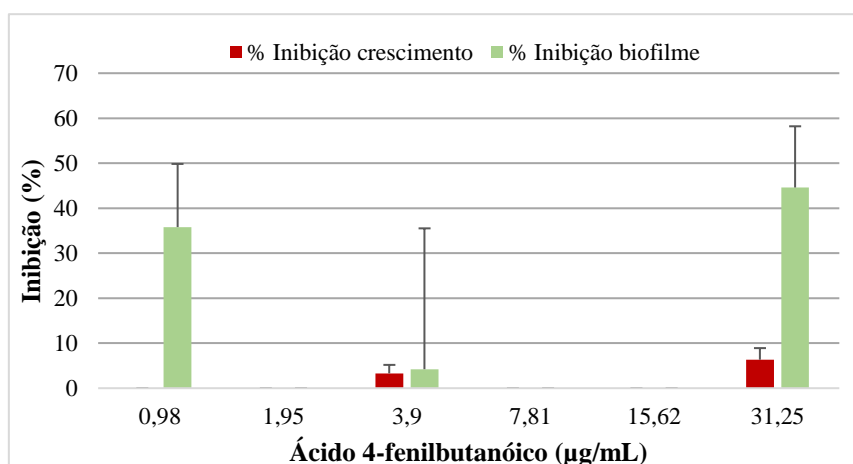


Figura 3.9. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus* para o composto ácido 4-fenilbutanóico. Estão representados os valores médios ($n=3$) e os respetivos erros padrão associados para cada concentração testada.

Pela análise do gráfico da figura 3.9 podemos verificar que a concentração mínima inibitória de biofilme foi de 0,98 µg/mL com uma percentagem de inibição de formação de biofilme de 35,8%, face a uma percentagem de inibição de crescimento nula. Apesar da atividade específica anti-biofilme ser reduzida, foi considerada suficiente para avaliar a validade do ensaio em desenvolvimento.

3.3.2. Desenvolvimento do ensaio para testar a atividade anti-*microfouling* utilizando pins

Para avaliar a atividade *anti-microfouling* do composto ácido 4-fenilbutanóico recorreu-se à utilização de pins flutuantes revestidos com as seguintes formulações de tinta: Hempel Olympic, Hempel Classic, Hempel Classic sem cobre, Hempel Classic sem cobre e com as seguintes concentrações de composto: 5, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.

Na figura 3.10 encontra-se representado o gráfico que relaciona a percentagem de inibição de crescimento e inibição de formação de biofilme com as diferentes formulações de tinta.

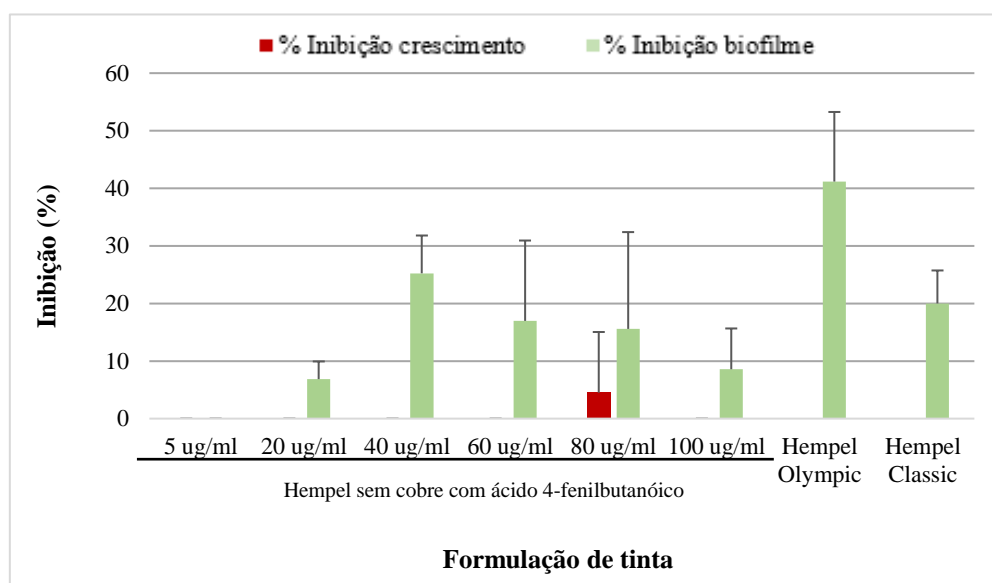


Figura 3.10. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus* para o composto ácido 4-fenilbutanóico a diferentes concentrações na tinta Hempel Classic sem cobre. Encontra-se também representada a percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição da formação de biofilme para as tintas *antifouling* fornecidas pela Hempel: Hempel Olympic e Hempel Classic. Estão representados os valores médios ($n=3$) e os respetivos erros padrão associados para cada formulação de tinta.

Através da análise do gráfico representado na figura 3.10 podemos constatar que as formulações de tintas testadas no ensaio anti-incrustação não inibiram o crescimento para valores acima de 40%, mas também não demonstraram ter atividade anti-biofilme. No entanto, as tintas Hempel Olympic e Hempel Classic não apresentaram resultados promissores na inibição de formação de biofilme formado pela bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, podendo tal ser devido ao facto deste tipo de tintas apresentar atividade anti-macroincrustação comprovada e sendo desconhecida a sua atividade anti-microincrustação.

As formulações de tinta às quais foram adicionadas diferentes concentrações de composto ácido 4-fenilbutanóico, 5, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram resultados de inibição de formação de biofilme promissores, sendo que a maior percentagem de inibição de formação de biofilme, 25%, foi obtida à concentração de composto ácido 4-fenilbutanóico de 40 $\mu\text{g/mL}$. Estes baixos resultados em termos de percentagem de inibição de formação de biofilme podem estar associados ao facto do DMSO, o solvente utilizado para dissolver o composto comercial, não evaporar durante o período de secagem, mantendo-se na formulação de tinta e conduzindo à sua diluição. Assim, a concentração de composto testada não corresponde à presente no filme de tinta.

Para além disto, durante o processo de quantificação de biofilme formado pela bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*, verificou-se formação de biofilme nas extremidades e no fundo dos poços da microplaca, biofilme esse que não foi quantificado. Esta observação levantou a hipótese dos resultados de inibição de biofilme obtidos poderem ter sido influenciados pelo facto da formação de biofilme à superfície do pin ser desvantajosa face ao poço da microplaca. Tal comportamento pode estar associado ao ângulo de curvatura do pin desfavorecer o estabelecimento de biofilme em comparação com uma superfície plana. Assim sendo, foi necessário adotar uma nova metodologia.

3.3.3. Atividade *anti-microfouling* do composto ácido 4-fenilbutanóico utilizando microplacas de 96 poços

A estratégia desenvolvida de seguida baseou-se na pintura dos poços de uma microplaca de 96 poços e na escolha de um novo solvente para dissolver o composto ácido 4-fenilbutanóico, de modo a evitar uma eventual diluição da formulação de tinta.

Foram testados os seguintes solventes: metanol, acetato de etilo, acetona, *white spirit*, óleo de linhaça, diluente e tetrahydrofurano. Dentro de todos os solventes utilizados, a acetona foi o único capaz de dissolver por completo o ácido 4-fenilbutanóico tendo ainda a vantagem de a sua rápida evaporação permitir que seja facilmente removida da formulação de tinta no período de secagem. O composto foi adicionado à tinta Hempel Classic sem cobre às concentrações de 0,1%, 1% e 5%. Na figura 3.11 encontra-se representado o gráfico com os resultados obtidos para o ensaio anti-incrustante com período de incubação de dois dias.

▪ Condições de incubação: dois dias, 28°C, sem agitação

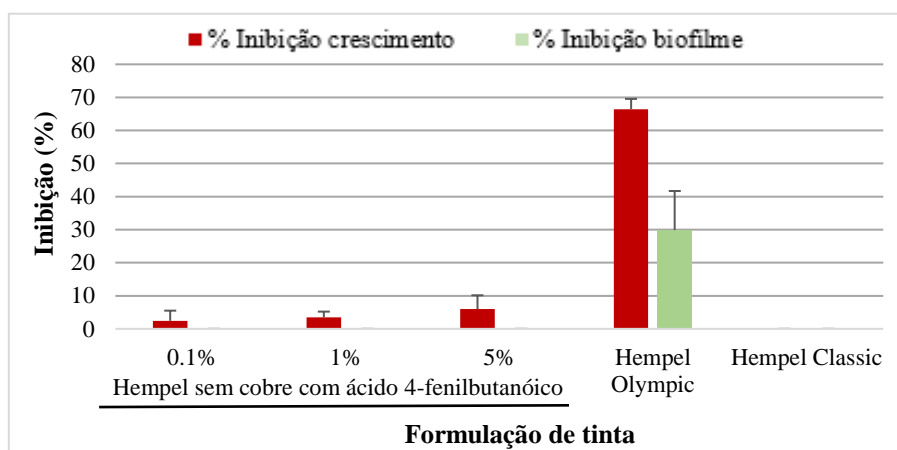


Figura 3.11. Resultados do ensaio com duração de dois dias de incubação. Foram testadas diferentes percentagens de ácido 4-fenilbutanóico na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se representados os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme das tintas comerciais: Hempel Classic e Hempel Olympic. Estão representados os valores médios (n=3) e os erros padrão associados a cada formulação de tinta.

Após um período de incubação de dois dias não se registou inibição de formação de biofilme para as formulações de tinta que incorporavam o ácido 4-fenilbutanóico, composto com atividade anti-biofilme comprovada. Estes resultados podem estar associados ao facto de dois dias não serem suficientes para que o composto seja libertado em quantidades capazes de inibir a formação de biofilme à superfície do poço.

A tinta Hempel Olympic apresentou capacidade de inibição de formação de biofilme, com uma percentagem de 29,8%, no entanto essa atividade revelou não ser específica dada a sua elevada atividade de inibição de crescimento bacteriano. O facto de não existirem bactérias leva obviamente a que não seja desenvolvido um biofilme, podendo ser essa a razão destes resultados.

A formulação de tinta Hempel Classic não demonstrou inibição do crescimento nem de formação de biofilme justificada pelo facto desta tinta apresentar apenas atividade contra organismos macro-incrustantes, assim como a tinta Hempel Olympic.

Os resultados obtidos para as tintas com o composto comercial incorporado sugerem a necessidade de mais tempo para o composto ser libertado para o meio. Assim sendo, aumentámos o tempo de incubação de dois dias para uma semana. Na figura 3.12 encontra-se representado o gráfico que relaciona os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as diferentes formulações de tinta.

▪ **Condições de incubação: uma semana, 28°C, sem agitação**

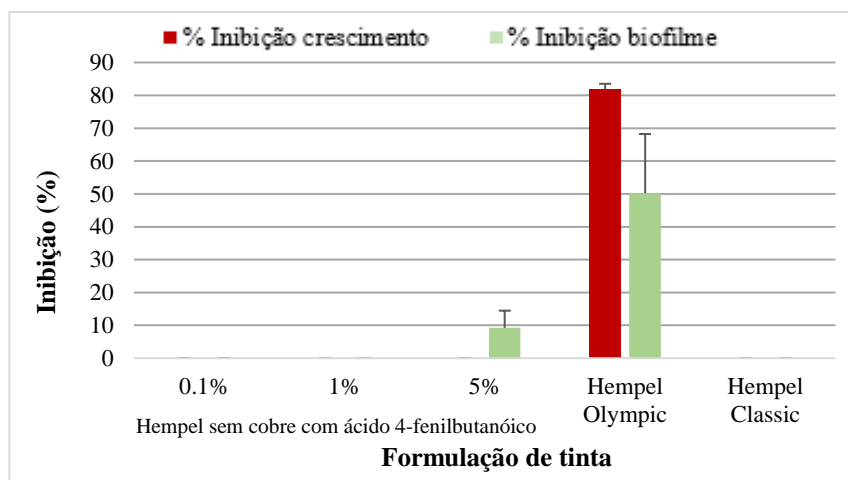


Figura 3.12. Resultados do ensaio com duração de uma semana de incubação. Foi testado o composto ácido 4-fenilbutanóico às concentrações de 0,1, 1 e 5% na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se representados os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme das tintas comerciais: Hempel Classic e Hempel Olympic. Estão representados os valores médios (n=3) e os erros padrão associados a cada formulação de tinta.

Como se pode constatar pela figura 3.12, o composto ácido 4-fenilbutanóico na concentração de 0,1 e 1% na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre não apresentou percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme. À percentagem de 5% verifica-se uma percentagem de inibição de biofilme de 9,2% e não se registou percentagem de inibição de crescimento.

Estes resultados sugeriram que ao aumentarmos o tempo de incubação, o composto se libertava do filme de tinta promovendo a inibição da formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus*. Os resultados da tinta comercial Hempel Olympic foram similares aos obtidos para o período de incubação de dois dias, ou seja, elevada atividade de inibição de crescimento conduzem à inibição de biofilme. Relativamente à tinta Hempel Classic não se verificou qualquer melhoria comparativamente aos resultados no ensaio de dois dias, ou seja, não houve inibição de crescimento nem inibição da formação de biofilme.

O tempo de realização do bioensaio foi alterado para um mês de incubação com o intuito de avaliar a atividade do composto ácido 4-fenilbutanóico ao longo do tempo. Na figura 3.13 encontra-se representado o gráfico que relaciona as percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme com as formulações de tinta testadas.

▪ **Condições de incubação: um mês, 28°C, sem agitação**

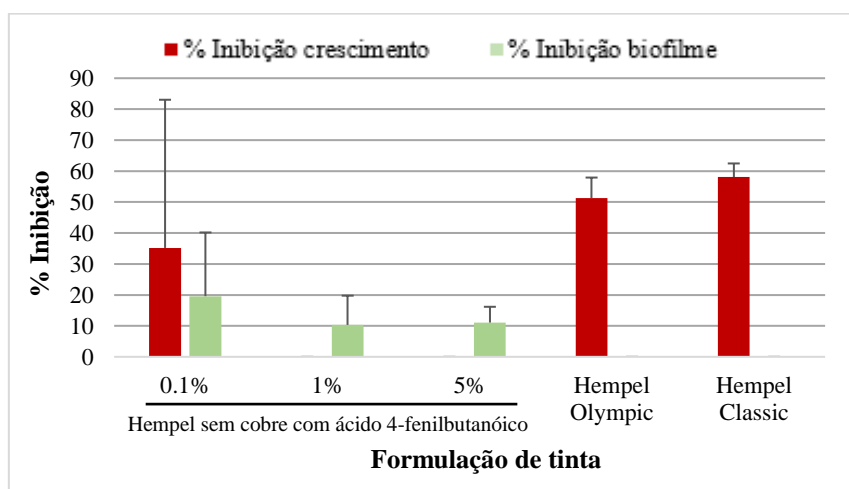


Figura 3.13. Resultados do ensaio anti-incrustante com um mês de incubação utilizando o composto ácido 4-fenilbutanóico às concentrações de 0,1, 1 e 5% na tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se também representados os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme de tintas comerciais: Hempel Classic e Hempel Olympic. Estão representados os valores médios (n=3) e os respetivos erros padrão associados para cada formulação de tinta.

Como se pode constatar pela figura 3.13, o composto ácido 4-fenilbutanóico, às concentrações de 1 e 5%, na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre, não apresentou atividade de inibição de crescimento. Relativamente às percentagens de inibição de formação de biofilme, verificou-se que foram semelhantes para ambas as concentrações, aproximadamente 10%. Com o aumento do período

de incubação verifica-se uma tendência para o aumento das percentagens de inibição de formação de biofilme.

Relativamente às tintas comerciais Hempel Olympic e Hempel Classic verificaram-se atividades de inibição de crescimento com valores de cerca de 50% e não se verificou atividade de inibição de formação de biofilme. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de um extenso período de contacto entre a cultura bacteriana e o filme de tinta promover a morte celular, um efeito que pode ser justificado pela capacidade bactericida associada ao cobre, o biocida incluído neste tipo de tintas. Para além disto, foram observadas contaminações por fungos em diversos poços da microplaca que poderão ter influenciado os resultados obtidos. A estratégia seguinte foi aumentar a área de superfície pintada.

3.3.4. Atividade *anti-microfouling* do ácido 4-fenilbutanóico utilizando placas de Petri

O aumento do tempo de incubação não conduziu à obtenção de bons resultados de inibição do biofilme formado pela bactéria em estudo. Assim sendo, optámos pelo aumento da superfície de contacto entre a cultura bacteriana e as tintas.

Tal foi alcançado pela utilização de placas de Petri de 5,5 cm de diâmetro pintadas com 5mL de cada uma das seis formulações de tinta em estudo. Após a incubação das placas de Petri durante uma semana a 28°C sob condições estáticas obtiveram-se os resultados representados na figura 3.14.

▪ Condições de incubação: uma semana, 28°C, sem agitação

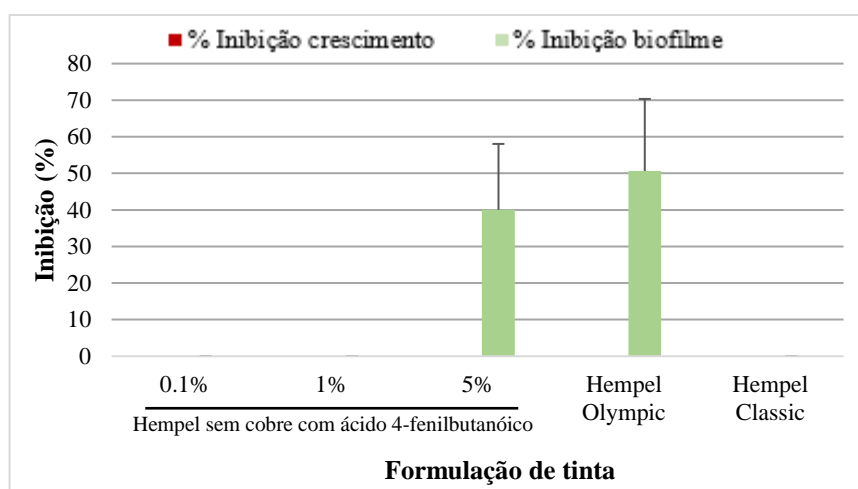


Figura 3.14. Resultados do ensaio com duração de uma semana de incubação. Foi testado o composto ácido 4-fenilbutanóico às concentrações de 0,1, 1 e 5% na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se representados os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme das tintas comerciais: Hempel Classic e Hempel Olympic. Estão representados os valores médios (n=3) e os erros padrão associados a cada formulação de tinta.

Nenhuma das formulações de tinta apresentou percentagens de inibição de crescimento, sendo este um aspeto positivo a ter em conta. Relativamente às tintas com o composto ácido 4-fenilbutanóico

incorporado foi verificada inibição de formação de biofilme para a concentração de 5%. Às restantes concentrações verifica-se uma percentagem de inibição de formação de biofilme nula.

É importante salientar que a percentagem de inibição de formação de biofilme obtida para a tinta com 5% de ácido 4-fenilbutanóico (40%) é semelhante à obtida pela formulação de tinta Hempel Olympic (50%), permitindo concluir que o composto está a ser libertado do revestimento e a inibir a colonização da superfície da placa de Petri pela bactéria alvo de estudo.

A obtenção destes resultados promoveu a realização de um ensaio anti-*microfouling* utilizando placas de Petri com a alteração do tempo de incubação de uma semana para um mês. Na figura 3.15 encontram-se os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme obtidos para as diferentes formulações de tinta.

▪ **Condições de incubação: um mês, 28°C, sem agitação**

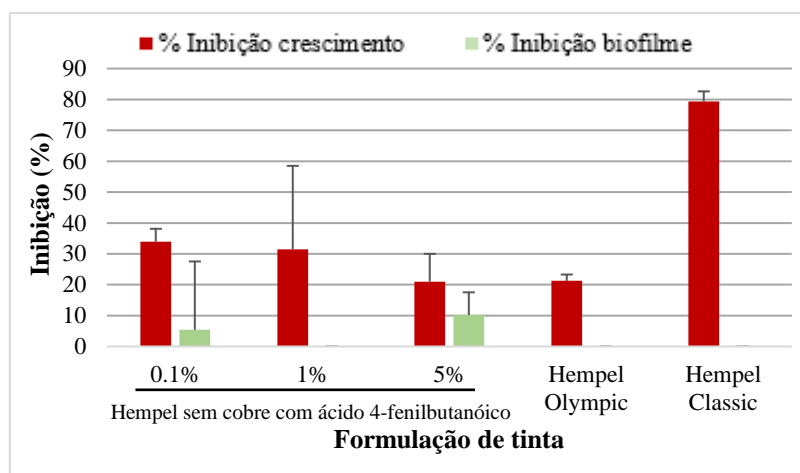


Figura 3.15. Resultados do ensaio com duração de um mês de incubação. Foi testado o composto ácido 4-fenilbutanóico às concentrações de 0,1, 1 e 5% na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se representados os resultados de inibição de crescimento e de formação de biofilme das tintas comerciais: Hempel Classic e Hempel Olympic. Estão representados os valores médios (n=3) e os erros padrão associados a cada formulação de tinta.

Os resultados obtidos para este ensaio revelam que, com o aumento do período de incubação, aumentam as probabilidades de se desenvolverem contaminações nas placas, como ocorreu neste caso, uma vez que algumas das placas de Petri se encontravam contaminadas com fungos que se desenvolveram na parte superficial da cultura bacteriana. Assim sendo, poderão ter sido estas contaminações que levaram à obtenção dos resultados apresentados na figura 3.15. Como podemos verificar, os resultados de inibição de crescimento obtidos para as tintas com o composto ácido 4-fenilbutanóico incorporado estão de acordo com os obtidos no ensaio com o mesmo tempo de incubação mas com a utilização de microplacas.

Para a tinta Hempel Antifouling Classic obteve-se uma inibição de crescimento bacteriano de 79% que poderá ter origem nas contaminações que foram observadas em todas as placas pintadas com esta formulação, figura.3.16.



Figura 3.16. Placas de Petri pintadas com a formulação de tinta Hempel Antifouling Classic com 5 mL de cultura bacteriana de *M. hydrocarbonoclasticus* e contaminadas por fungos.

3.3.5. Comparação dos ensaios anti-microfouling desenvolvidos

Ao comparar as três metodologias abordadas ao longo deste processo de otimização podemos confirmar que o bioensaio que envolveu a pintura de placas de Petri conduziu à obtenção de melhores resultados. A uma concentração de 5% de ácido 4-fenilbutanóico na formulação de tinta Hempel Classic sem cobre registou-se uma inibição de formação de biofilme de 40%.

Nas tabelas 3.6 e 3.7 encontram-se registados os valores de inibição de crescimento e de formação de biofilme de cada uma das concentrações testadas nos dois ensaios realizados, com placas de Petri e com microplacas, durante um período de incubação de uma semana e de um mês, respetivamente. Os resultados obtidos para o ensaio com os pins revestidos não se encontram representados nas tabelas 3.6 e 3.7 devido ao facto de não terem sido usadas as mesmas concentrações de composto ácido 4-fenilbutanóico.

Tabela 3.6. Comparação dos resultados obtidos durante um período de incubação de uma semana para duas das metodologias desenvolvidas: pintura de microplacas e placas de Petri. O erro associado encontra-se igualmente expresso para cada um dos ensaios. N.I.-Não Inibe.

<u>Ensaio de uma semana</u>		Microplacas		Placas de Petri	
		% Inibição crescimento	% Inibição de formação de biofilme	% Inibição crescimento	% Inibição de formação de biofilme
Hempel Classic sem cobre	0,1% ácido 4-fenilbutanóico	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
	1 % ácido 4-fenilbutanóico	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
	5 % ácido 4-fenilbutanóico	N.I.	9,23±5,23	N.I.	40,0±18,0

Tabela 3.7. Comparação dos resultados obtidos durante um período de incubação de um mês para duas das metodologias desenvolvidas: pintura de microplacas e placas de Petri. O erro associado encontra-se igualmente expresso para cada um dos ensaios. N.I.-Não Inibe.

<u>Ensaio de um mês</u>		Microplacas		Placas de Petri	
		% Inibição crescimento	% Inibição de formação de biofilme	% Inibição crescimento	% Inibição de formação de biofilme
Hempel Classic sem cobre	0,1% ácido 4-fenilbutanóico	35,1±47,9	19,5±20,6	33,9±4,2	5,41±22,12
	1 % ácido 4-fenilbutanóico	N.I.	10,3±9,5	31,4±27,0	N.I.
	5 % ácido 4-fenilbutanóico	N.I.	11,0±5,1	21,0±9,0	10,1±7,4

Deste processo de otimização conclui-se que, para tempos de incubação baixos, de uma semana, o aumento da área superficial através da utilização de placas de Petri em detrimento de microplacas de 96 poços, conduz à obtenção de percentagens de inibição de formação de biofilme da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* semelhantes às percentagens de inibição da tinta Hempel Olympic, que apresenta atividade anti-macroincrustação.

O aumento do período de incubação das superfícies pintadas conduziu a resultados inconclusivos devido ao desenvolvimento de contaminações, não sendo possível manter condições de esterilidade durante tanto tempo.

3.4. Atividade anti-microfouling de uma nova formulação de tinta com um composto natural incorporado

A naporadiomicina, PTM-420, F2+3, F22, que apresentou poderosa atividade anti-biofilme contra a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* foi incorporada na tinta Hempel Classic sem cobre às concentrações de 0,1 e 1%. A concentração de 5% não foi testada devido a massas insuficientes para o bioensaio anti-microfouling. As tintas antifouling comerciais Hempel Olympic e Hempel Classic foram testadas para comparação, devido ao facto de apresentarem atividade anti-macroincrustante comprovada.

Na figura 3.17 encontra-se representado o gráfico que relaciona as formulações de tinta testadas com as respetivas percentagens de inibição de crescimento e de formação de biofilme.

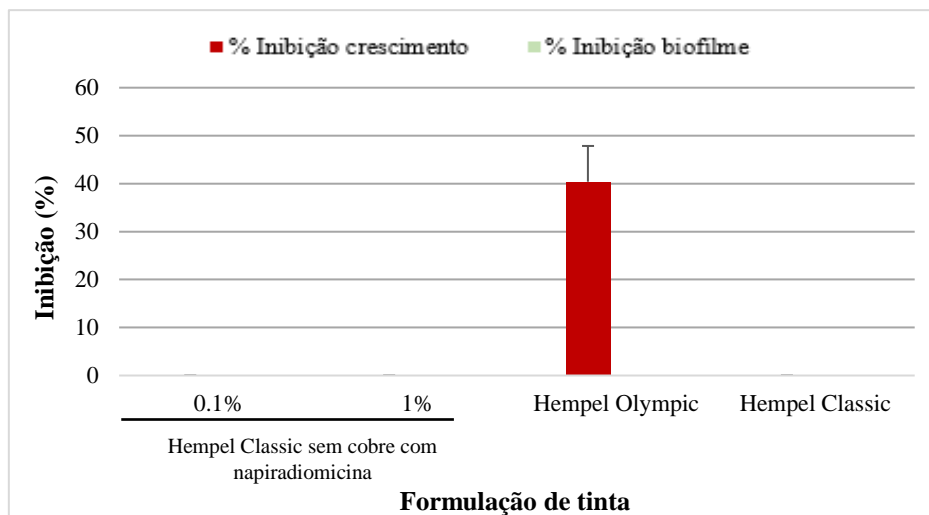


Figura 3.17. Percentagem de inibição de crescimento e percentagem de inibição de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus* para a napiradiomicina, PTM-420, F2+3, F22, às concentrações de 0,1 e 1% na tinta Hempel Classic sem cobre. Encontram-se também representadas as percentagens de inibição de crescimento e percentagens de inibição da formação de biofilme para as tintas *antifouling* fornecidas pela Hempel: Hempel Olympic e Hempel Classic. Estão representados os valores médios (n=3) e os respectivos erros padrão associados para cada formulação de tinta.

Pela análise da figura 3.17 podemos constatar que a napiradiomicina não inibiu o crescimento e a formação de biofilme às duas concentrações testadas. Estes resultados podem ser justificados pelo facto de um ensaio de uma semana não ser suficiente para permitir que o composto se liberte do filme de tinta que reveste as placas de Petri. Porém, aumentar o período de realização do bioensaio não é uma perspetiva favorável, uma vez que no processo de otimização se verificou que não era possível manter a esterilidade do ensaio durante um mês. Neste ensaio anti-microincrustante não foi testada a concentração do composto a 5%, que promoveu a obtenção de percentagem de inibição de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus* idêntica à da tinta comercial Hempel Olympic no bioensaio de uma semana como o composto ácido 4-fenilbutanóico.

Futuramente, esta concentração deve ser testada com o intuito de comprovar se, a concentrações mais elevadas, o composto apresenta capacidade de inibição de formação de biofilme. Para além disto, o facto de o composto ser libertado por lixiviação, pode interferir com a sua difusão do filme de tinta. A encapsulação do composto PTM-420, F2+3, F22 em microcápsulas poderá ser uma alternativa viável à sua lixiviação do filme de tinta, uma vez que este tipo de mecanismo permite a libertação controlada do agente *antifouling* da superfície pintada.

A tinta *antifouling* Hempel Olympic apresentou percentagem de inibição de crescimento bacteriano de 40,3%, podendo ser justificada pelo carácter bactericida do cobre.

CAPÍTULO 4.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

4. Conclusão e perspectivas futuras

Este trabalho permitiu a identificação de seis novos compostos naturais produzidos por actinobactérias marinhas de diferentes estirpes de *Streptomyces aculeolatus* com potente atividade anti-biofilme contra a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*. Estes compostos não demonstraram atividade inibitória do crescimento e inibiram a formação de biofilme com valores iguais ou superiores a 80%.

Estes excelentes resultados permitiram classificar estes compostos como fortes candidatos a agentes anti-incrustantes uma vez que apresentaram atividade anti-*microfouling* e anti-*macrofouling*. A potente atividade contra a fixação das larvas de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (CIIMAR) poderá dever-se à ação destes compostos na primeira etapa de desenvolvimento de incrustação biológica, ou seja, no desenvolvimento de biofilme, uma vez que os compostos PTM-29, F6, F56; PTM-81, F5+6, F63; PTM-81, F5+6, F65; PTM-346, F4, F31; PTM-346, F4, F42 e PTM-420, F2+3, F22 apresentam atividade anti-*microfouling* impedindo que os organismos de maiores dimensões consigam colonizar as superfícies.

Procedeu-se ao desenvolvimento e otimização de um novo ensaio para a avaliação da capacidade anti-microincrustante destes compostos naturais incorporados em tintas para cascos de navio.

Foram testadas três metodologias distintas: pins, microplacas e placas de Petri revestidos com tintas *antifouling* e sem atividade *antifouling*. A pintura de placas de Petri com diferentes formulações de tinta com posterior inoculação da bactéria formadora de biofilme *M. hydrocarbonoclasticus* e incubação de uma semana revelou ser a melhor metodologia.

Após otimização do bioensaio com o composto comercial ácido 4-fenilbutanóico, incorporou-se o composto natural PTM-420, F2+3, F22 com atividade de anti-biofilme de 84,4%, às concentrações de 0,1 e 1% na tinta Hempel Classic sem cobre. A sua capacidade anti-incrustante foi avaliada recorrendo à pintura de placas de Petri não tendo sido observada atividade de inibição de crescimento e de formação de biofilme de *M. hydrocarbonoclasticus*. Estes resultados permitem concluir que o composto PTM-420, F2+3, F22 a baixas concentrações, 0,1 e 1%, não confere proteção anti-microincrustante. Tal pode ser justificado pelo facto do ensaio ter sido realizado durante um curto período de tempo, impossibilitando a libertação do composto do filme de tinta, ou pelas baixas concentrações testadas, podendo este não ser eficiente às concentrações de 0,1 e 1%.

Assim, deverá ser realizado um novo bioensaio com concentrações mais elevadas do composto natural com o intuito de avaliar a sua capacidade anti-microincrustante.

Para além disto, de futuro, os compostos com promissora atividade anti-biofilme PTM-29, F6, F56, PTM-81, F5+6, F63, PTM-81, F5+6, F65, PTM-346, F4, F31 e PTM-346, F4, F42 serão incorporados na tinta Hempel Classic sem cobre de modo a verificar a sua capacidade anti-microincrustação.

Futuramente, serão realizados ensaios de ecotoxicidade nos compostos que revelarem actividade *antifouling*. As novas formulações deverão ser sujeitas a testes mecânicos, testes de lixiviação e ensaios *antifouling* em alto mar. Deverão ser testadas técnicas alternativas para a incorporação dos compostos naturais na tinta sem sobre, como a utilização de microcápsulas ou micelas.

A incorporação destes novos compostos *antifouling* em formulações de tintas, permite a sua utilização para a pintura de cascos de navios e de estruturas estáticas submersas na água do mar como pilares de pontes rodoviárias ou plataformas petrolíferas.

Para além da aplicação marítima, estes compostos podem ser testados relativamente à sua capacidade antimicrobiana contra estirpes de *Staphylococcus aureus* com o intuito de desenvolver tintas para hospitais para o revestimento de maçanetas de portas e estruturas metálicas das camas hospitalares de modo a reduzir ou a evitar infeções hospitalares.

Uma outra perspetiva futura passa pela contínua procura de novos compostos *antifouling* produzidos por outras estirpes de actinobactérias marinhas e sua posterior elucidação estrutural.

CAPÍTULO 5.

BIBLIOGRAFIA

Abarzua, S., Jakubowski, S., 1995. Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series*, 123, pp.301–312.

Almeida, E., Diamantino, T., Sousa, O., 2007a. Breve História das Tintas Antivegetativas. *Corros. Prot. Mater.*, 26(1).

Almeida, E., Diamantino, T., Sousa, O., 2007b. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress In Organic Coatings*, 59, pp.2–20.

Annous, B., Fratamico, P., Smith, J., 2009. Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *Journal of Food Science*, 74(1), pp.24–37

Arahal, D., Castillo, A., Ludwig, W., Schleifer, K., Ventosa, A., 2002. Proposal of Cobetia marina gen. nov., comb. nov., within the Family Halomonadaceae, to Include the Species Halomonas marina. *Systematic and Applied Microbiology*, 211, pp.207–211.

Bixler, G., Bhushan, B., 2012. Biofouling : lessons from nature. *Philosophical transactions of the royal society*, pp.2381–2417.

Bull, A.T., Ward, A., Goodfellow, M., 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3). pp.573–603.

Castro, B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, 34(6), pp.1021–1031.

Chambers, L.D., Stokes, K.R., Walsh, F.C., Wood, R.J.K., 2006. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), pp.3642–3652.

Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp.22–32.

Cho, J.Y., Kang, J.Y., Hong, Y.K., Baek, H.H., Shin, H.W., Kim, M.S., 2012. Isolation and Structural Determination of the Antifouling Diketopiperazines from Marine-Derived Streptomyces praecox 291-11. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(6), pp.1116–1121.

Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., 1992. A new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, (25), pp.568–576.

Cobet, A.B., Jones, G.E., Albright, J., Simon, H., Wirsén, C., 1971. The Effect of Nickel on a Marine Bacterium: Fine Structure of Arthrobacter marinus. *Journal of General Microbiology*, 66(2), pp.185–196.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T., Nickel, J., Dasgupta, M., Marrie, T., 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review Microbiology*, 41, pp.435–464.

Davey, M.E., Toole, G., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp.847–867.

Davies, D.G., Parsek, R., Pearson, J., Igleski, B., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280, pp.295–298.

Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksh, P., Valerie, P., 2015. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*, pp.892–905.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp.881–890.

Ekblad, T. *et al.*, 2008. Poly(ethylene glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments. *Biomacromolecules*, 9, pp.2775–2783.

Flemming, H.C., 1991. Biofouling in water treatment. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. pp-48-80.

Florian, L. *et al.*, 2015. The marine bacteria *Cobetia marina* DSMZ 4741 synthesizes an unexpected K-antigen-like exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 124, pp.347–356.

Da Gama, B.A.P., Pereira, R.C., Coutinho, R. 2009. Bioincrustação marinha. In: Pereira, R.C., Soares-Gomes, A. *Biologia Marinha*. 2ª edição, Interciência, Rio de Janeiro, pp. 299-318.

Gauthier, M., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.C., 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(4), pp.568–576.

Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997. Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11, pp.160–67.

Gopikrishnan, V., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Pazhanimurugan, R., Balagurunathan, R., 2016. Antibiofouling potential of quercetin compound from marine-derived actinobacterium, *Streptomyces fradiae* PE7 and its characterization. *Environ Sci Pollut Res*.

Gorshkova, N.M. *et al.*, 2003. *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, pp.2073–2078.

Haefner, B., 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8(12), pp.536–544.

Hall-stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment To Infectious Diseases. *Nature Reviews*, 2, pp-95-108

Jensen, P.R., Gontang, E., *et al.*, 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 7, pp.1039–1048.

Jensen, P.R., Mincer, T.J., *et al.*, 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, pp.43–48.

Joshi, P., Wadhwani, T., Bahaley, P., 2010. Microbial ChitChat : Quorum Sensing Microbial. *The Journal of Life Sciences*, 4, pp.59–72.

Kaiser, J., Zuin, S., Wick, P., 2013. Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry ? A critical opinion. *Science of the Total Environment*, 442, pp.282–289.

Kiran, M.D. *et al.*, 2008. Discovery of a Quorum-Sensing Inhibitor of Drug-Resistant Staphylococcal Infections by Structure-Based Virtual Screening. *Molecular Pharmacology*, 73(5), pp.1578–1586.

Kwasny, S.M., Opperman, T.J., 2010. Static biofilm cultures of gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Chapter 13, Unit 13A8.

Lam, K.S., 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Ecology and industrial microbiology*, pp.245–251.

Lee, J. *et al.*, 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *The journal of microbiology*, 39(4), pp.254–264.

Li, X. *et al.*, 2006. Antifouling diketopiperazines produced by a deep- sea bacterium , *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling*, 22(3), pp.187–194.

Magin, C.M., Cooper, S.P., Brennan, A.B., 2010. Non-toxic antifouling strategies. *Materials Today*, 13(4), pp.36–44.

Martins, T.L., Vargas, V.M.F., 2013. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, 8(1), pp.1–11.

Mieszkin, S. *et al.*, 2012. Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae. *Biofouling*, 28(9), pp.953–968.

Mincer, T.J. *et al.*, 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), pp.5005–5011.

Monroe, D., 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5(11), pp.2458–2461.

Motohashi, K. *et al.* 2008. Terpenoids produced by actinomycetes: napyradiomycins from *Streptomyces antimycoticus* NT17. *J. Nat. Prod.* 71, pp.595–601.

Nithya, C., Devi, M.G., Pandian, S.K., 2011. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in Gram-positive and Gram-negative species. *Biofouling*, 27(5), pp.519–528.

Omae, I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 17, pp.81–105.

Pinori, E. *et al.*, 2011. Multi-seasonal barnacle (*Balanus improvisus*) protection achieved by trace amounts of a macrocyclic lactone (ivermectin) included in rosin-based coatings. *Bifouling*, 27(9), pp.941–953.

Salta, M., 2012. Method development for enhanced antifouling testing using novel natural products against marine biofilms. Faculty of Engineering and The Environment Engineering Sciences, University of Southampton.

Satheesh, S., *et al.*, 2015. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms-A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, pp.1–10.

Silva, E.R. *et al.*, 2012. Revestimentos Poliméricos para o controlo da bioincrustação industrial: Novas estratégias amigas do ambiente. *Química 134*, pp.43–49.

Souza, F.D. *et al.*, 2010. Bacterial assay for the rapid assessment of antifouling and fouling release properties of coatings and materials. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37, pp.363–370.

Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), pp.572–585.

Subramani, R., Aalbersberg, W., 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), pp.571–580.

Toole, G., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), pp.295–304.

Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D., 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*, 119, pp.1–11.

Ventosa, A., Márquez, M.C., 2005. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier *et al.* 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen *et al.* 1999 are heterotypic synonyms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp.1349–1351.

Vickery, K. *et al.*, 2013. A review of bacterial biofilms and their role in device- associated infection. *Healthcare Infection*, 18, pp.61–66.

Vimala, R., 2016. Marine organisms : A potential source of natural antifouling metabolites. *International Journal of ChemTech Research*, 9(1), pp.208–217.

Voulvoulis, N. *et al.*, 1999. Alternative Antifouling Biocides. *Applied Organometallic Chemistry*, 13, pp.135–143.

Wahl, M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, 58, pp.175–189.

Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, City of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), pp.2675–2679.

Welch, K., Cai, Y., Strømme, M., 2012. Functional Biomaterials A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *Journal of Functional Biomaterials*, 3, pp.418–431.

Woods Hole Oceanographic Institution, 1952. Marine Fouling and Its Prevention. Woods Hole, Massachusetts.

Xavier, J.B. *et al.*, 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, 76, pp.1–12.

Xu, Y. *et al.*, 2009. Inhibitory Effects of a Branched-Chain Fatty Acid on Larval Settlement of the Polychaete *Hydroides elegans*. *Mar Biotechnol*, 11, pp.495–504.

Xu, Y. *et al.*, 2010. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresource Technology*, 101(4), pp.1331–1336.

Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-johansen, K., 2004. Antifouling technology-past , present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, pp.75–104.

CAPÍTULO 6.

ANEXOS

Anexo 1.1. Resultados dos compostos testados relativamente à inibição de crescimento e de formação de biofilme, que apresentaram resultados fora dos limites estabelecidos de inibição de crescimento e de formação de biofilme da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus*. Encontram-se apenas representadas as maiores percentagens de inibição de formação de biofilme que cada composto apresenta bem como os erros padrão associados. N.I.-Não Inibe.

Código do composto	Concentração (µg/ml)	Inibição do crescimento (%)	Inibição da formação de biofilme (%)
PTM-29, F2, F20	31,25	N.I.	48,2 ± 6,0
PTM-29, F2, F29	1,95	N.I.	53,0 ± 16,9
PTM-29, F3, F48	15,62	N.I.	34,7 ± 11,9
PTM-29, F3, F61	1,95	N.I.	50,4 ± 8,3
PTM-29, F4, F39	3,90	N.I.	56,0 ± 14,5
PTM-29, F5, F18	7,8	N.I.	50,9 ± 4,9
PTM-29, F5, F25	31,25	N.I.	48,3 ± 2,0
PTM-29, F5, F34	7,81	N.I.	27,7 ± 9,2
PTM-29, F5, F39	1,95	N.I.	51,5 ± 6,8
PTM-29, F5, F41	1,95	N.I.	43,9 ± 7,2
PTM-29, F6, F26	0,98	N.I.	74,5 ± 5,3
PTM-29, F6, F30	3,90	N.I.	74,1 ± 3,0
PTM-29, F6, F31	3,90	3,47 ± 6,15	70,8 ± 4,6
PTM-29, F6, F33	3,90	N.I.	52,5% ± 0,1
PTM-29, F6, F35	7,81	N.I.	61,3 ± 8,1
PTM-29, F6, F38	15,62	N.I.	73,6 ± 5,3
PTM-29, F6, F45	1,95	N.I.	64,5 ± 8,3
PTM-29, F6, F48	7,81	N.I.	48,6 ± 14,3
PTM-29, F6, F55	3,90	N.I.	67,4 ± 5,2
PTM-29, F6, F58	3,90	N.I.	69,3 ± 5,9
PTM-29, F7, F19	15,62	N.I.	70,3 ± 2,0
PTM-29, F7, F27	3,90	9,77 ± 2,0	31,7 ± 13,0
PTM-29, F7, F32	15,62	10,0 ± 4,4	24,8 ± 19,2
PTM-81, F2+3, F52	0,98	N.I.	74,6 ± 5,32
PTM-81, F2+3, F54	7,81	N.I.	33,8 ± 5,2
PTM-81, F2+3, F57	0,98	N.I.	62,3% ± 6,9
PTM-81, F2+3, F66	1,95	N.I.	61,6 ± 9,2
PTM-81, F2+3, F69	1,95	N.I.	71,0 ± 1,1
PTM-81, F2+3, F71	3,90	N.I.	57,7 ± 14,9
PTM-81, F5+6, F54	3,90	4,25 ± 0,97	52,6 ± 9,7
PTM-81, F5+6, F57	15,62	N.I.	76,0 ± 6,8
PTM-346, F4, F25	0,98	N.I.	50,7 ± 5,4
PTM-346, F4, F34	15,62	N.I.	57,9 ± 3,4
PTM-346, F4, F39	0,98	13,6 ± 1,9	32,0 ± 4,1
PTM-346, F4, F41	15,62	5,70 ± 0,86	30,2 ± 4,1
PTM-346, F4, F45	1,95	N.I.	49,6 ± 3,6
PTM-346, F6, F37	1,95	N.I.	58,0 ± 4,5
PTM-420, F2+3, F20	3,90	N.I.	67,6 ± 1,8
PTM-420, F2+3, F25	31,25	N.I.	61,9 ± 8,6
PTM-420, F2+3, F27	0,98	N.I.	64,4 ± 3,8
PTM-420, F2+3, F35	0,98	N.I.	70,9 ± 3,9

PTM-420, F2+3, F39	3,90	N.I.	72,4 ± 3,4
PTM-420, F4, F15	0,98	N.I.	64,8 ± 4,8
PTM-420, F4, F25	31,25	N.I.	51,1 ± 19,7

Anexo 1.2. Resultados dos compostos testados relativamente à inibição de crescimento e de formação de biofilme, que apresentaram resultados fora dos limites estabelecidos de inibição de crescimento e de formação de biofilme da bactéria *C.marina*. Encontram-se apenas representadas as maiores percentagens de inibição de formação de biofilme que cada composto apresenta bem como os erros padrão associados. N.I.-Não Inibe.

Código do composto	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (%)	Inibição de formação de biofilme (%)
PTM-29, F2, F20	3,90	5,53 ± 4,35	N.I.
PTM-29, F2, F29	31,25	N.I.	23,3 ± 8,0
PTM-29, F3, F48	15,62	15,0 ± 6,1	N.I.
PTM-29, F3, F54	1,95	13,1 ± 0,8	N.I.
PTM-29, F3, F61	15,62	15,7 ± 5,4	N.I.
PTM-29, F4, F33	15,62	N.I.	19,9% ± 9,1
PTM-29, F4, F39	3,90	N.I.	21,7% ± 2,0
PTM-29, F5, F25	7,81	N.I.	25,8 ± 2,4
PTM-29, F5, F34	0,98	12,7 ± 2,4	N.I.
PTM-29, F5, F39	15,62	15,2 ± 4,2	22,0 ± 6,9
PTM-29, F6, F26	15,62	N.I.	10,3 ± 6,4
PTM-29, F6, F30	7,81	N.I.	58,3 ± 17,3
PTM-29, F6, F31	15,62	24,7 ± 1,2	57,2 ± 25,6
PTM-29, F6, F33	31,25	3,61 ± 7,23	1,72 ± 11,27
PTM-29, F6, F35	7,81	N.I.	66,4 ± 15,2
PTM-29, F6, F38	1,95	1,47 ± 2,24	N.I.
PTM-29, F6, F45	1,95	6,29 ± 1,99	N.I.
PTM-29, F6, F48	7,81	N.I.	5,77 ± 7,30
PTM-29, F6, F55	15,62	1,49 ± 2,06	21,2 ± 3,7
PTM-29, F6, F56	1,95	N.I.	41,7 ± 10,6
PTM-29, F6, F58	-	N.I.	N.I.
PTM-29, F7, F19	7,81	N.I.	12,0 ± 7,3
PTM-29, F7, F27	31,25	9,61 ± 3,39	17,1 ± 9,5
PTM-29, F7, F32	3,90	2,94 ± 2,13	N.I.
PTM-81, F2+3, F52	31,25	N.I.	25,5 ± 27,2
PTM-81, F2+3, F54	0,98	23,1 ± 2,6	11,3 ± 3,3
PTM-81, F2+3, F57	0,98	7,44 ± 3,66	N.I.
PTM-81, F2+3, F66	3,90	7,07 ± 9,09	N.I.
PTM-81, F2+3, F69	1,95	2,66 ± 1,16	18,4 ± 9,3
PTM-81, F2+3, F71	3,90	10,8 ± 5,4	N.I.
PTM-81, F5+6, F57	7,81	N.I.	11,3 ± 5,7
PTM-81, F5+6, F63	1,95	3,27 ± 9,93	12,1 ± 5,9
PTM-81, F5+6, F65	-	N.I.	N.I.
PTM-346, F4, F31	3,90	N.I.	1,34 ± 28,47
PTM-346, F4, F34	1,95	10,3 ± 1,9	N.I.
PTM-346, F4, F39	15,62	6,44 ± 11,00	N.I.
PTM-346, F4, F41	-	N.I.	N.I.

PTM-346, F4, F42	3,90	$8,93 \pm 7,77$	N.I.
PTM-346, F4, F45	3,90	$4,04 \pm 5,19$	N.I.
PTM-346, F6, F37	3,90	N.I.	$31,4 \pm 5,0$
PTM-420, F2+3, F12	0,98	$10,7 \pm 0,5$	N.I.
PTM-420, F2+3, F18	7,81	$5,55 \pm 3,88$	$20,5 \pm 6,4$
PTM-420, F2+3, F20	-	N.I.	N.I.
PTM-420, F2+3, F22	0,98	N.I.	$29,5 \pm 5,6$
PMT 420, F2+3, F25	0,98	$11,1 \pm 5,3$	N.I.
PTM-420, F2+3, F27	3,90	N.I.	$16,7 \pm 16,2$
PTM-420, F2+3, F35	0,98	$13,9 \pm 3,5$	N.I.
PTM-420, F2+3, F39	1,95	N.I.	$24,7\% \pm 6,3$
PTM-420, F4, F15	0,98	$21,6 \pm 2,4$	N.I.
PTM-420, F4, F25	0,98	$9,18 \pm 4,06$	$46,8 \pm 8,9$